RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes

Universidad
Nacional
de Quilmes

Pastorini, Mercedes

Superantígenos virales como herramientas terapéuticas en linfomas y leucemias : un abordaje utilizando sistemas heterólogos de expresión

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:
Pastorini, M. (2025). Superantígenos virales como herramientas terapéuticas en linfomas y leucemias: un abordaje utilizando sistemas heterólogos de expresión. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/5751

Puede encontrar éste y otros documentos en: https://ridaa.unq.edu.ar

Universidad
Nacional
de Quilmes

Roque Sáenz Peña 352 // Bernal
Buenos Aires // Argentina
t.: (+41 11) 4365 7100
f.: (+54 11) 4365 7101
info@unq.edu.ar

Mercedes Pastorini, Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto,
Julio de 2025, pp. 246,
http://ridaa.unq.edu.ar,
Universidad Nacional de Quilmes
Doctorado en Ciencia y Tecnología

Superantígenos virales como herramientas terapéuticas en linfomas y leucemias: un abordaje utilizando sistemas heterólogos de expresión

TESIS DOCTORAL

Mercedes Pastorini

merpastorini@yahoo.com.ar

Resumen

Las leucemias y los linfomas fueron la décima y onceava causa de muerte global relacionada con cáncer durante 2022. Mientras que las terapias actuales causan la remisión del 70-90% de los pacientes, quienes sufren recaídas no poseen alternativas terapéuticas. Sumado a esto, los tratamientos actuales implican toxicidades agudas y tardías de distintas índoles. Teniendo en cuenta este contexto, resulta necesaria la implementación de terapias eficaces, específicas y seguras para mejorar el pronóstico de los pacientes con leucemias y linfomas. En Argentina, durante el periodo 2000-2007, los niños y las niñas con diagnóstico con leucemias linfoblásticas presentaron una sobrevida estimada del 69% a 36 meses del diagnóstico.

Los superantígenos (SAgs) son moléculas de naturaleza peptídica que interactúan de forma no convencional con linfocitos T o B. Específicamente, los superantígenos del MMTV poseen una linfotoxicidad específica hacia linfocitos T, induciendo su activación y posterior apoptosis en los clones linfocitarios reactivos. Dicha actividad biológica dio lugar a la propuesta de esta tesis, donde se caracterizan distintas estrategias para el abordaje terapéutico contra leucemias y linfomas, a través de la expresión de cuatro variantes de SAgs del MMTV en sistemas heterólogos.

En este marco, se realizó la vehiculización de los SAgs BALB2, BALB14, LA y mtv-7 en VLPs derivadas de la proteína Z del virus Junín y en VLPs producidas en sistemas bacterianos. Además, se evaluó la actividad biológica de las VLPs producidas en sistemas eucariotas incubando las partículas con células mononucleares de sangre periférica de voluntarios sanos. Por último, se expresaron los cuatro SAgs como subunidad en sistemas bacterianos, con el propósito de contar con esta herramienta accesoria en los ensayos in vitro. Además, se realizó el diseño inicial de un protocolo para la caracterización del repertorio de linfocitos T en muestras humanas mediante PCR de tiempo final. Para diseñar

conjuntos de primers específicos que permitan realizar el seguimiento de la acción de los SAgs, se determinaron las homologías entre variantes de Vβ murinas y humanas, y se propuso una posible especificidad entre las cuatro variantes de SAgs a través de herramientas bioinformáticas. Por último, se exploró la vehiculización del SAg BALB2 en la cara externa de VLPs generadas en sistemas bacterianos mediante dos estrategias distintas, mediante el uso del sistema AP205 y nanojaulas sintéticas utilizando el sistema SpyCatcher/SpyTag.

En conjunto, el presente trabajo de tesis presenta los resultados globales respecto al diseño integral de una herramienta terapéutica desde la generación de las construcciones moleculares requeridas para la expresión de SAgs en sistemas heterólogos, hasta la optimización preliminar de un protocolo para evaluar su potencialidad como tratamiento contra leucemias y linfomas.

Directora: Dra. Mercedes Alemán (IMEX-CONICET)
Codirectora: Dra. Sandra E. Goñi (LVE, IMBA-UNQ-CIC)

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

La presente tesis de doctorado fue desarrollada en colaboración bajo la dirección de la Dra. Mercedes Alemán del Laboratorio de Inmunología Experimental del Instituto de Medicina Experimental de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires (IMEX-ANM) y bajo la codirección de la Dra. Sandra Elizabeth Goñi del Laboratorio de Virus Emergentes (LVE) del Instituto de Microbiología Básica y Aplicada (IMBA-CIC-UNQ) del Departamento de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes

La misma fue posible gracias a una Beca Interna Doctoral de CONICET en Temas Estratégicos, subsidios otorgados por la Universidad Nacional de Quilmes, la Fundación Roberto Roemmers y la Fundación Florencio Fiorini

Además, también fue posible gracias a una beca de investigación a corto plazo otorgada por la Fundación Fulbright-Secretaría de Educación para hacer una estancia de 3 meses en la Universidad de Nuevo México, Albuquerque, Estados Unidos.

Las imágenes de la portada y las carátulas son de autoría de diversas ilustradoras argentinas que han otorgado autorización para ser utilizadas en la presente tesis.

La pieza gráfica de la portada es parte del banco de imágenes que los y las estudiantes desarrollaron en la materia Ilustración Editorial, Catedra Roldán, FADU-UBA, durante el 1er cuatrimestre de 2024. Conforman una campaña en Defensa de la ciencia argentina.

Las portadas de la Sección I son de autoría de Cynthia Orensztain, las de la Sección II han sido creadas por Pupi Herrera, las de la Sección III son de la ilustradora Laura Varsky, las de la Sección IV pertenecen a Sonia Basch y la de la Sección V es de la autoría de Pilar Dibujito.

GLOSARIO

7-AAD: 7-aminoactinomicina D
ADN: Ácido Desoxirribonucleico
ADNc: ADN complementario
AP205: *Acinetobacter Phage 205*
ARN: Ácido Ribonucleico
ATC: Ácido Tricloro Acético
BCR: Receptor de Células B
BSA: *Bovine Serum Albumin*
CAR-T: *Chimeric Antigen Receptor T-cell*
CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*
CDR: Región Determinante de la Complementariedad
CDs: Células Dendríticas
CFSE: *Carboxyfluoresceinsuccinimidyl ester*
CMV: Citomegalovirus
CPA: Célula Presentadora de Antígenos
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DMSO: Dimetil sulfóxido
DO: Densidad Óptica
DOC: Detergente de desoxicolato sódico
DTT: Ditiotreitol
eGFP: *enhanced Green Fluorescent Protein*
ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent Assay*
FHA: Fiebre Hemorrágica Argentina
FITC: *Fluorescein IsoTioCyanate*
FL1: *Fluorescence Channel 1*
FSC: *Forward Scatter*
Fw: *Forward*
GM-CSF: *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*
HCT: Hematocrito
HEK: *Human Embryonic Kidney cells*
HEL: *Hen Egg Lyzozyme*
HERV: Retrovirus Endógenos Humanos
HGB: Hemoglobina
HRP: *Horseradish Peroxidase*
HT: HisTag
IDH: Índice de Desarrollo Humano
IFM: Intensidad de Fluorescencia Media
IFN-ɣ: Interferón gamma
IMGT: Sistema de Información Internacional ImMunoGeneTics
IP: Ioduro de Propidio
IPTG: Isopropil ß-D-1-tiogalactopiranósido
JUNV: Virus Junín
LAL: *Limulus Amebocyte Lysate*
LAMP-1: *Lysosomal Associated Membrane Protein 1*
LB: Luria-Bertani
LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda
LLC: Leucemia Linfocítica Crónica
LMA: Leucemia Mielocítica Aguda
LMC: Leucemia Mielocítica Crónica
LPS: Lipopolisacárido
LTR: *Long Terminal Repeat*
MCS: *Multiple Cloning Site*
MHC: *Major Histocompatibility Complex*
MLR: *Mixed Lymphocyte Reaction*
MLS: *Minor lymphocyte stimulatory*
M-MLV: Virus de la Leucemia Murina de Moloney
MMTV: *Mouse Mammary Tumor Virus*
ON: *Overnight*
ORF: *Open Reading Frame*
PBMC: *Perispheral Blood Mononuclear Cells*
PBS: *Phosphate-buffered Saline*
PCR: *Polymerase Chain Reaction*
PE: *Phycoerythrin*
PEG: Polietilenglicol
PEI: Polietilenimina
PFA: Paraformaldehído
pI: Punto Isoeléctrico
PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF: Fluoruro de Polivinilideno
RPM: Revoluciones por minuto
RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*
Rv: *Reverse*
SAg: Superantígeno
SCB: *Sample Column Buffer*
SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate*
SEE: *Staphylococcal Enterotoxin E*
SFB: Suero fetal Bovino
SLEV: *Saint Louis Encephalitis Virus*
SSC: *Side Scatter*
STR: *Short Tandem Repeats*
SV40: *Simian Virus* 40
TAE: Tris Acetato EDTA
TCR: Receptor de Células T
TEM: Microscopía Electrónica de Transmisión
TMB: Tetrametilbencidina
UE: Unidades de Endotoxina
UV: Ultravioleta
VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VLPs: *Virus-like particles*
VPH: Virus del Papiloma Humano
Vβ: Región variable de la cadena beta del TCR
WB: *Western Blot*
WBC: *White Blood Cells*
WT: *Wild Type*

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS 4

GLOSARIO 5

ÍNDICE 6

SECCIÓN I: FUNDAMENTOS GENERALES PARA EL PROYECTO 13

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN 14

CÁNCER EN LA SANGRE: LEUCEMIAS Y LINFOMAS **15**

El cáncer y sus terminologías 15

Linfomas y leucemias 15

Epidemiología de linfomas y leucemias 18

Epidemiología de linfomas y leucemias en Argentina 20

Tratamientos tradicionales actuales 21

Propuestas terapéuticas alternativas 23

INMUNOLOGÍA Y VACUNOLOGÍA **24**

Respuestas inmunológicas y su clasificación 24

Respuestas inmunológicas celulares 24

Presentación de antígenos 25

Linfocitos T 27

El receptor de los linfocitos T 27

Regiones variables de la cadena β del TCR 28

Vacunología y cáncer 29

***VIRUS-LIKE PARTICLES* COMO PLATAFORMAS PARA EL DESARROLLO PROFILÁCTICO Y TERAPÉUTICO** **30**

***Virus-like particles* (VLPs)** 30

La proteína Z del virus Junín 31

VLPs generadas a partir de la proteína Z de JUNV 33

SUPERANTÍGENOS: ANTÍGENOS CON PROPIEDADES ÚNICAS **34**

Superantígenos 34

Superantígenos bacterianos y virales 35

EL VIRUS DEL TUMOR MAMARIO MURINO Y SUS SUPERANTÍGENOS **37**

Virus del Tumor Mamario Murino (MMTV) 37

Transmisión del MMTV 38

MMTV en seres humanos ¿Un viejo enemigo? 40

Superantígenos del MMTV 41

Antecedentes del Instituto de Leucemia Experimental 43

CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 45

Hipótesis **46**
Objetivo general **46**
Objetivos específicos **46**
SECCIÓN II: MATERIALES Y MÉTODOS 47
MATERIALES Y MÉTODOS COMPARTIDOS ENTRE TODOS LOS CAPÍTULOS 48
Técnicas de biología celular y molecular **48**
Cultivo celular 48
Materia viva 48
Mantenimiento de líneas celulares 48
Transfección de células eucariotas animales 49
Expresión y recolección de sobrenadantes 49
Purificación de VLPs 50
Análisis y validación de las VLPs 51
Cuantificación de VLPs 51
Biología molecular 52
Cultivos bacterianos 52
***Stocks* bacterianos** 52
Purificación de plásmidos 52
Electroforesis de ácidos nucleicos 52
Producción de marcadores de peso molecular de ADN 53
Digestiones enzimáticas 53
Preparación de bacterias competentes térmicas 53
Transformación térmica y siembra en placa 54
Selección de bacterias recombinantes 54
Secuenciación de ácidos nucleicos 56
Electroforesis de proteínas 57
Western Blotting 57
MATERIALES Y MÉTODOS DEL CAPÍTULO III 59
Materia viva **59**
Cuidado de los animales de laboratorio **59**
Declaración ética **59**
Generación de VLPs **60**
Western Blotting **60**
Densitometría de bandas **61**
Ensayo de LAL **61**
Obtención de células dendríticas derivadas de médula ósea **61**
Ensayos de inmunocitoquímica **62**
Inmunización de ratones y diseño experimental **62**
Caracterización *ex-vivo* de linfocitos **63**

Separación de células mononucleares **64**
Marcación con anticuerpos y citometría de Flujo **64**
Cuantificación de la producción de IFN-γ **65**
Estado madurativo *in vivo* de CDs **65**
Evaluación de las respuestas humorales **66**
Análisis estadísticos **66**
MATERIALES Y MÉTODOS DE LOS CAPÍTULOS IV Y V 67
Generación de las herramientas de vehiculización y expresión **67**
Diseño *in silico* de la estrategia de clonado 67
Diseño de *primers* 67
Clonado Molecular **68**
Materia viva 68
Vector de clonado 69
Vector de expresión eucariota 69
Vector de expresión procariota 69
Obtención de los moldes de partida para la generación de los insertos 70
Purificación de ARN total 71
Síntesis del ARN complementario 71
Obtención de los insertos mediante PCR punto final 72
Obtención de los fragmentos para su clonado 74
Purificación de ácidos nucleicos en tacos de agarosa utilizando sílica 74
Ligación y transformación de bacterias 74
Selección de bacterias recombinantes 75
Transferencia de insertos a vectores de expresión 75
Análisis bioinformático **76**
Caracterización del repertorio de linfocitos T **77**
Purificación de ARN celular total 77
Caracterización molecular de la actividad biológica 78
Caracterización de cadenas Vβ del receptor de linfocitos T 79
Diseño de paneles de *primers* y bioinformática 80
Vehiculización de superantígenos virales en VLPs producidas en células de mamífero **81**
Materia viva 81
Transfección de células eucariotas animales 81
Purificación de VLPs 81
Validación y cuantificación de VLPs 81
Caracterización de la actividad biológica de las VLPs **82**
Ensayos *in vitro* utilizando sangre periférica de dadores sanos 82
Declaración de ética para el uso de muestras 82
Purificación de células mononucleares de sangre periférica 82

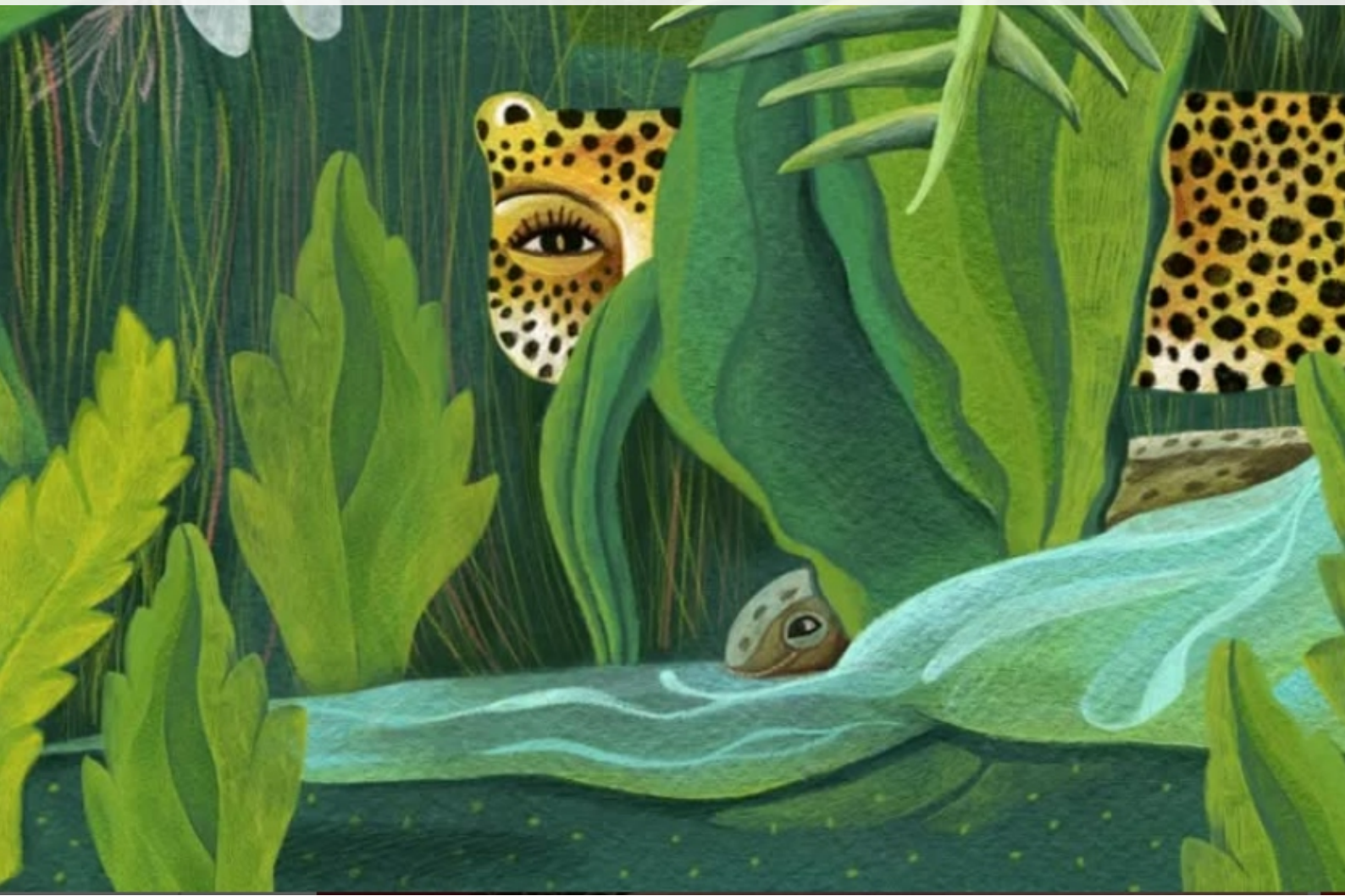
Tinción de células mononucleares con CFSE 82
Cultivos primarios de PBMCs de dadores sanos 82
Microscopía de campo claro 83
Tinción con ioduro de propidio u 7-AAD y Anexina-V 83
Citometría de Flujo 83
Estadística 84
Expresión y purificación de superantígenos virales en sistemas bacterianos **84**
Materia viva 84
Transformación de bacterias *E. coli Rosetta* 84
Prueba de expresión a pequeña escala 84
Optimización de la expresión a pequeña escala 85
Análisis de solubilidad a pequeña escala 85
Producción de proteínas recombinantes 86
Fraccionamiento y solubilización de cuerpos de inclusión 86
Purificación por cromatografía de afinidad 87
Eliminación de urea mediante diálisis en dos pasos 87
Evaluación del efecto del pH sobre la solubilidad de las proteínas recombinantes 88
MATERIALES Y MÉTODOS DEL CAPÍTULO VI 89
Generación de las herramientas de vehiculización y expresión **89**
Diseño *in silico* de las herramientas 89
Obtención de las construcciones plasmídicas 90
Clonado Molecular 90
Materia viva 90
Transformación de bacterias mediante choque eléctrico 91
Transferencia de insertos a los vectores de expresión 92
Análisis *in silico* de las secuencias obtenidas 92
Vehiculización de superantígenos virales utilizando el sistema AP205 ..... **93**
Materia viva 93
Transformación de bacterias 93
Prueba de expresión a pequeña escala 93
Optimización de la expresión a pequeña escala 94
Producción de VLPs 94
Análisis de la solubilidad de las VLPs 95
Purificación de VLPs 95
Caracterización de VLPs 96
Vehiculización de superantígenos virales en nanojaulas sintéticas utilizando el sistema SpyCatcher/SpyTag **96**
Materia viva 96
Transformación de bacterias *E. coli* BL21 97

Prueba de expresión a pequeña escala de VLPs SpyCatcher 97
Producción y purificación de VLPs SpyCatcher 97
Depleción de LPS en VLPs SpyCatcher 98
Microscopía Electrónica de Transmisión 98
Prueba de expresión a pequeña escala de los antígenos SpyTag-BALB2 98
Optimización de la expresión de SpyTag-BALB2 99
Producción y purificación de las proteínas SpyTag-BALB2 99
Solubilización de cuerpos de inclusión y purificación por cromatografía de pseudoafinidad 99
Evaluación del efecto del DTT en la solubilidad de las proteínas SpyTag-BALB2 100
Conjugación de VLPs SpyCatcher con las proteínas SpyTag-BALB2 101
SECCIÓN III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN 102
CAPÍTULO III: CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA CELULAR DE LAS VLPS$_{Z\text{-}EGFP}$ 103
INTRODUCCIÓN **104**
***Virus-like particles* y su destino inmunológico** 104
Evaluación de respuestas celulares 104
Antecedentes de las VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ 105
Respuestas celulares *in vitro* causadas por VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ 106
Resultados y discusión **109**
Producción y control de calidad de las VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ 109
Captura de VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ por CDs diferenciadas a partir de médula ósea murina 111
La transición de experimentos *in vitro* a modelos animales 112
Análisis de los linfocitos B tras la inmunización con VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ 116
Análisis de la activación de linfocitos T tras la inmunización con VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ 119
Análisis de las funciones efectoras de linfocitos T tras inmunización con VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ 121
Conclusiones **124**
CAPÍTULO IV: HERRAMIENTAS PARA LA EXPRESIÓN Y VEHICULIZACIÓN DE SAGS DEL MMTV EN SISTEMAS HETERÓLOGOS 127
INTRODUCCIÓN **128**
Uso del sistema de VLPs$_{Z}$ para nuevos desarrollos 128
Linfomas y leucemias como objetivo terapéutico 128
Superantígenos del MMTV 129
Caracterización de variantes de MMTV en ILEX 129
SAgs para el tratamiento de linfomas y leucemias 130
Resultados y discusión **131**
Generación de las herramientas de vehiculización y expresión 131
Estrategia del clonado molecular 131
Obtención de los insertos 133
Transferencia de los insertos a los vectores de expresión 137

Selección de colonias recombinantes 139
Análisis bioinformático 142
Expresión de SAgs en sistemas bacterianos 144
Análisis bioinformáticos 145
Pruebas de expresión a pequeña escala 146
Verificación de la identidad de los superantígenos expresados 148
Optimización de la expresión 150
Análisis de la solubilidad de las proteínas 151
Expresión a mediana escala y purificación 154
Expresión de SAgs en células de mamífero 158
Análisis bioinformáticos 159
Ensayos de expresión en monocapas celulares eucariotas 159
Producción y purificación de $VLPs_{Z\text{-}SAgs}$ 161
Conclusiones **167**
CAPÍTULO V: CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y PROPUESTA DE UN MÉTODO PARA EL ANÁLISIS DEL REPERTORIO DE LINFOCITOS T 170
INTRODUCCIÓN **171**
Superantígenos virales como potencial terapia contra linfomas y leucemias 171
Caracterización de cadenas Vβ en linfocitos T 172
Resultados y discusión **172**
Diseño experimental 172
Evaluación de la actividad biológica utilizando células mononucleares humanas 173
Caracterización de actividad biológica específica 179
Homología entre humanos y ratones 185
Conclusiones **186**
CAPÍTULO VI: VEHICULIZACIÓN DE SAGS VIRALES DEL MMTV EN VLPS UTILIZANDO SISTEMAS BACTERIANOS 188
INTRODUCCIÓN **189**
VLPs generadas utilizando la proteína Z de JUNV 189
Estrategias para el desarrollo de VLPs 189
VLPs derivadas de bacteriófagos 191
Resultados y discusión **192**
Vehiculización de BALB2 utilizando el sistema AP205. 192
Diseño experimental 192
Clonado molecular 192
Transferencia de los insertos al vector de expresión 194
Análisis bioinformáticos 195
Expresión de las construcciones en E. Coli 196
Optimización de la expresión de las construcciones en *E. Coli* 197

Vehiculización de BALB2 en nanojaulas sintéticas utilizando el sistema SpyCatcher/SpyTag 202
Diseño experimental 202
Análisis bioinformáticos 202
Producción, purificación y caracterización de las nanojaulas 203
Expresión, producción y purificación de los antígenos 207
Conjugación de antígenos a las nanojaulas 211
CONCLUSIONES **212**
SECCIÓN IV: CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y MATERIAL COMPLEMENTARIO 214
CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS 215
CAPÍTULO VIII: ANEXO DE PREPARACIÓN DE SOLUCIONES 225
Cultivo celular **226**
Purificación de VLPs **226**
Biología molecular **226**
Cultivos bacterianos 226
Clonado molecular 226
Electroforesis de geles 227
Preparación de bacterias competentes térmicas 227
Western Blotting 227
ELISA 228
Producción de proteínas recombinantes y solubilización de cuerpos de inclusión 228
Diálisis 228
Purificación de VLPs en bacterias 228
CAPÍTULO IX – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 229
SECCIÓN V – AGRADECIMIENTOS 244

SECCIÓN 1: FUNDAMENTOS GENERALES PARA EL PROYECTO



CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

CÁNCER EN LA SANGRE: LEUCEMIAS Y LINFOMAS

El cáncer y sus terminologías

Se denomina cáncer a un gran grupo de enfermedades que pueden comenzar en cualquier órgano o tejido del cuerpo, cuando células anormales crecen fuera de control, escapando de sus límites normales para invadir otros órganos (Organización Mundial de la Salud [OMS], s.f.). Las células anormales o transformadas, atraviesan cambios en sus parámetros morfológicos, bioquímicos o de crecimiento. Cuando se habla de neoplasia, se hace referencia a una masa anormal de tejido que aparece tras una multiplicación descontrolada de células, o la falta de respuesta a los mecanismos de muerte celular (Instituto Nacional del Cáncer [NIH] , 2011). Las neoplasias pueden ser benignas, ya que el proceso de transformación no significa que la célula sea cancerosa, para que ello ocurra, es necesario un proceso de carcinogénesis. Dicho fenómeno, también llamado oncogénesis, es complejo, conlleva muchos pasos y como resultado se origina cáncer en un organismo (Cann, 2012).

Las células cancerosas atraviesan una serie de etapas llamadas fases, las cuales se determinan dependiendo del tipo de cambios que sufrieron, diferenciándose de las células sanas o no transformadas. La determinación de la fase es clave para estimar la progresión de la enfermedad y definir el mejor tratamiento posible para lograr la remisión del paciente. Mientras que las fases de la mayoría de los tipos de cánceres que constan de tumores sólidos se determinan mediante el tamaño y la diseminación del tumor primario, para los tumores líquidos, como lo son las leucemias y los linfomas, es muy diferente. En estos tipos de cáncer, las fases se determinan de acuerdo con el recuento de las células de la sangre y la acumulación de células cancerosas en algunos órganos como el hígado y el bazo (*Mofitt Cancer Center*, s.f.).

Linfomas y leucemias

El término linfoma describe un cáncer que tiene origen en los órganos del sistema linfático, el cual está compuesto de órganos como el bazo, el timo, el apéndice, las amígdalas, la médula ósea y todos los ganglios linfáticos. Tanto los linfocitos B como los T, se originan en la médula ósea, y una vez maduros, circulan por el sistema linfático para encontrarse con el antígeno que los activará. Aunque hay muchas células inmunes que pueden desarrollar procesos oncológicos, en los linfomas las células que dan origen al cáncer son únicamente linfocitos B o T. Sin embargo, los diagnósticos de linfoma se basan en la presencia o ausencia de células de Hodgkin/Reed-Sternberg en ganglios linfáticos: linfomas de Hodgkin y linfomas no Hodgkin respectivamente (Mayo Clinic, s.f.). Las células de Reed-Sternberg son linfocitos T o B anormalmente grandes, que pueden contener más de un núcleo. Por otra parte, los linfomas se diagnostican con respecto a los marcadores celulares encontrados en las células

malignas y el sitio anatómico donde hay presencia de células cancerosas (*American Cancer Society*, 2024).

Por su parte, las leucemias se definen como un cáncer de los tejidos que forman la sangre, pudiendo involucrar a algunas de las células que la componen como los glóbulos rojos, monocitos, linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NKT o mastocitos. También las células cancerosas pueden haberse originado en la médula ósea o en el sistema linfático (*Mayo Clinic*, s.f.).

A grandes rasgos, las leucemias se pueden clasificar de acuerdo con dos criterios. Uno de ellos es la velocidad de su progresión, diferenciándose entre formas agudas y crónicas de la enfermedad. Las formas agudas, implican que las células anormales son células de la sangre inmaduras o también llamadas blastos. Como no se encuentran en su estado final de diferenciación, no pueden llevar a cabo las funciones celulares normales ni responden a los sistemas de homeostasis, presentando una tasa de proliferación exacerbada por la médula ósea, causando un rápido avance de la enfermedad. Por su parte, las formas crónicas poseen una gran heterogeneidad, pero comparten que las células anormales se encuentran en un estadio de mayor diferenciación que las formas agudas. Pueden producirse muchas o pocas células, pero las mismas se replican o se acumulan más lentamente. Además, su funcionalidad es normal durante un determinado periodo de tiempo. Es por ello que las leucemias crónicas son formas más leves que las agudas (*Mayo Clinic*, s.f.).

El segundo criterio, responde al linaje celular que da origen a las células anormales, pudiendo ser mieloides o linfoides (**Figura 1**).

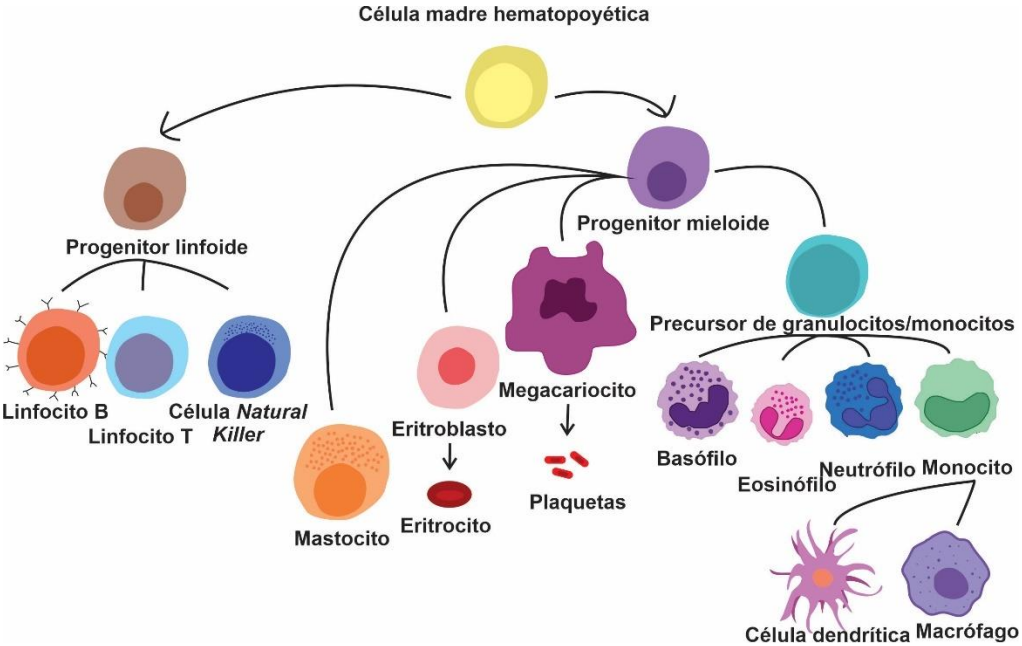


Figura 1. Linajes de progenitores celulares que dan lugar a los distintos tipos de células de la sangre. En la parte superior se muestra la célula madre hematopoyética que da lugar a los progenitores de los dos linajes. Por un lado, las que se diferencian a partir del progenitor linfoide (células B, células T y células *Natural Killer*) y, por otro lado, las que se generan a partir del progenitor mieloide (mastocitos, eritrocitos, plaquetas, basófilos, eosinófilos, neutrófilos y monocitos). Adaptado de Murphy & Weaver, 2016.

Considerando los criterios de clasificación mencionados anteriormente, las leucemias se distinguen en cinco tipos principales (*Mayo Clinic*, s.f.):

- **Leucemia linfoblástica aguda (LLA)**: Es la forma más común de leucemia en individuos menores de 20 años. El riesgo de desarrollar este tipo de enfermedad es mayor en niños y niñas menores de 5 años de edad.
- **Leucemia mielocítica aguda (LMA)**: Puede ocurrir en adultos y en niños, pero es el tipo más común de leucemia aguda en personas adultas.
- **Leucemia linfocítica crónica (LLC)**: Es la leucemia crónica más común en adultos, cuyos síntomas pueden demorar años en aparecer.
- **Leucemia mielocítica crónica (LMC)**: Este tipo de leucemia afecta mayormente individuos adultos.
- **Otros tipos de leucemias**: Por fuera de los principales tipos de leucemias hay casos más raros que incluyen leucemia de células peludas (tricoleucemia), síndromes mielodisplásicos y desórdenes mieloproliferativos.

La diferencia principal entre las leucemias linfoblásticas y los linfomas es que, en las leucemias, las células cancerosas se encuentran principalmente en la sangre y la médula ósea, mientras que en los linfomas tienden a estar en los ganglios linfáticos y en otros tejidos linfoides (*Cancer American Society*, s.f.).

Epidemiología de linfomas y leucemias

Los linfomas y las leucemias son la forma más común de neoplasias hematológicas, y de acuerdo al Observatorio Global de Cáncer de la Organización Mundial de la Salud, las leucemias fueron la décima causa de muerte global relacionada con cáncer en el año 2022 y los linfomas no Hodgkin fueron la causa onceava ese mismo año (OMS, s.f.).

Con respecto a los linfomas, la mayoría de los casos son de tipo no Hodgkin, considerando 553.389 casos diagnosticados en el año 2022 a nivel mundial contra 82.469 casos de tipo Hodgkin (*Cancer American Society*, s.f.). Los linfomas no Hodgkin pueden ocurrir a cualquier edad, pero el riesgo de desarrollarlo aumenta a lo largo de la vida y más de la mitad de los pacientes diagnosticados poseen 65 años o más (*American Cancer Society*, s.f.). De acuerdo con la Sociedad Americana de Cáncer, la tasa de supervivencia a 5 años para personas con diagnóstico de linfoma tipo no Hodgkin en Estados Unidos es del 74%. Sin embargo, las probabilidades pueden variar de acuerdo a los diferentes tipos y estadios de avance de la enfermedad (*American Cancer Society*, s.f.).

En la **Figura 2** se muestran las tasas de incidencia de leucemia en personas de sexo masculino, estandarizada por edad. A pesar que se observa que Australia es el país con mayor incidencia a nivel mundial con un 11,7, la mayoría de los casos de leucemias se concentran en el continente asiático, alcanzando una incidencia del 46,6% de todos los casos en 2022 y una mortalidad del 51,8% (OMS, s.f.). Con respecto a las formas más graves de leucemia, el 54% de los casos de leucemias agudas se encuentran en pacientes menores de 20 años, y la LLA representa un 75-80% de todos los casos de leucemia en pacientes pediátricos, siendo la causa principal de muerte en la población pediátrica, especialmente en los países de bajos a medianos ingresos, donde ocurren el 94% de las muertes relacionadas con leucemia (Mohammadian-Hafshejani et al., 2024).

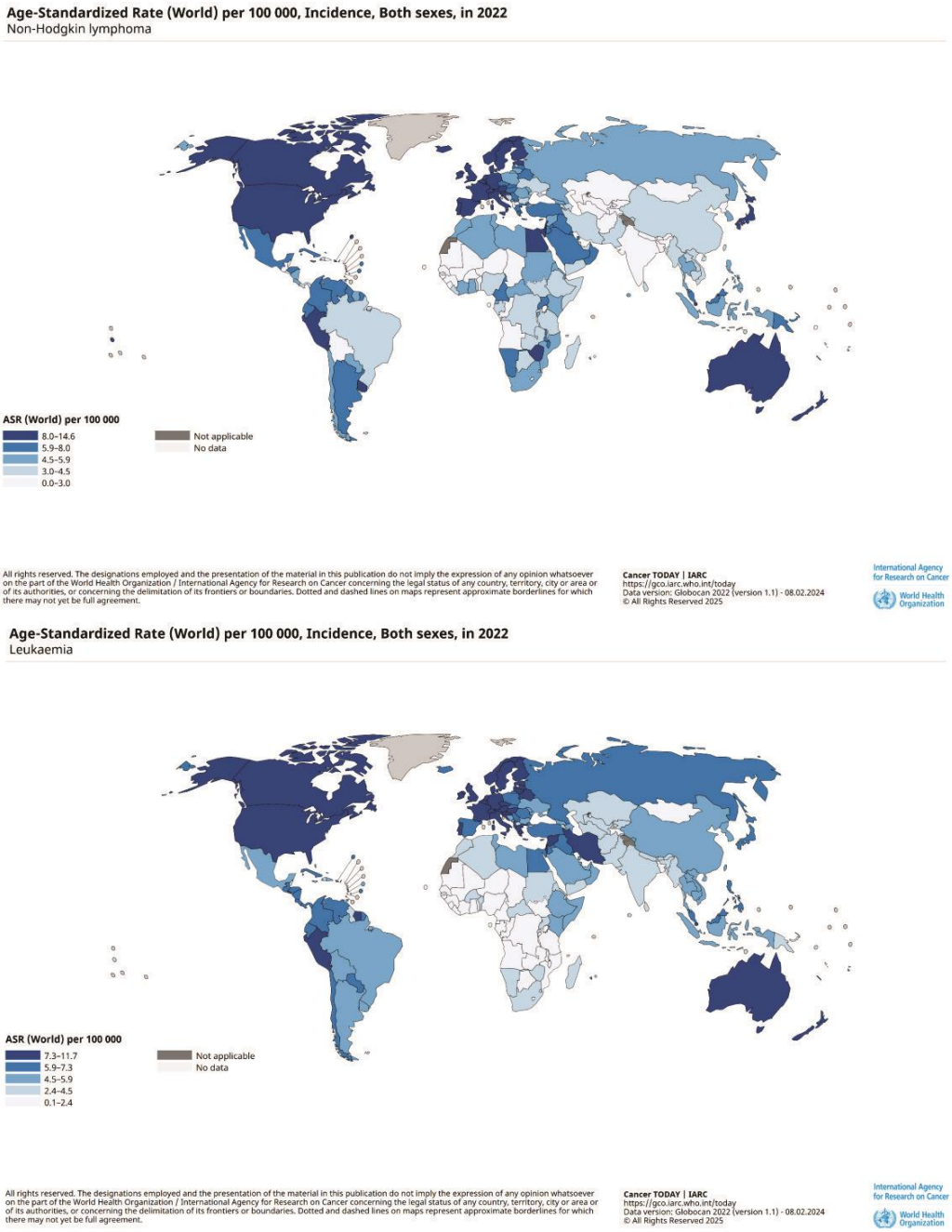


Figura 2. Mapa mundial de incidencia de linfomas no Hodgkin y leucemias en el año 2022 en personas de sexo masculino. Se muestran las incidencias estandarizadas por edad cada 100.000 habitantes para ambas patologías en función de cada país, utilizando una escala de colores. Arriba. Linfoma no-Hodgkin. Abajo: Leucemia. Extraído de la International Agency for Research on Cancer (IARC), (OMS, s.f.).

En varios estudios se ha encontrado mayor incidencia de la enfermedad en individuos con ancestría europea en comparación con personas que poseen ancestros africanos. Un estudio publicado en 2022 reportó que las LLA eran más prevalentes entre niños latinos/hispánicos viviendo en Estados Unidos, observándose un riesgo aumentado mayor a

2 veces en comparación con el resto de la población pediátrica (de Smith et al., 2022). Sumado a esto, otro estudio reportó una significativamente mayor incidencia de LLA en pacientes menores de 20 años de origen hispánico en comparación con grupos de otros orígenes étnicos, siendo de 4,3 casos cada 100.000 personas de la población analizada (Bispo et al., 2020).

La LLC es más común en adultos y sobre todo en individuos masculinos, siendo particularmente afectada la población blanca. La edad media de diagnóstico es mayor a los 70 años de edad y la tasa de supervivencia a cinco años es alrededor del 88% (NIH, s.f.; Stauder et al., 2017). Al tratarse de formas menos agresivas de leucemia, entre el 70 y 80% de los pacientes no muestran síntomas al momento del diagnóstico y sólo un tercio de los mismos recibe tratamientos para dicha patología (Shadman, 2023).

Epidemiología de linfomas y leucemias en Argentina

En Argentina, de acuerdo a los últimos datos brindados por el Instituto Nacional del Cáncer, entre los años 2000 y 2013, se reportaron 18.069 casos de cáncer en niños menores de 15 años de edad. Las leucemias constituyeron la enfermedad oncológica más frecuente en casos pediátricos seguida de los tumores del sistema nervioso central y los linfomas. La sobrevida estimada a los 5 años del diagnóstico para el período 2000-2009 fue del 60% para las Leucemias y del 74% para los Linfomas. Para ese mismo periodo las leucemias linfoblásticas fueron el 77% de los diagnósticos y causaron el 66% de los fallecimientos totales a causa de cáncer. Los linfomas no Hodgkin se correspondieron con el 28% de los casos totales y causaron el 42% de los fallecimientos (Instituto Nacional del Cáncer, 2015).

Tras un análisis del periodo 2000-2007 se observó que los niños diagnosticados con leucemias linfoblásticas presentan una sobrevida estimada del 69% a 36 meses del diagnóstico. El pronóstico de estos niños depende de la edad, del tipo de institución tratante, del Índice de Desarrollo Humano (IDH) de la provincia de origen y si ocurrió o no migración asistencial. Los menores de un año tienen el peor pronóstico a los 36 meses del diagnóstico, seguidos por los niños de 10 a 14 años, con una sobrevida de 36% y 59% respectivamente. Además, se encontró que los niños oriundos de provincias con IDH bajo tienen menor sobrevida que el resto (Instituto Nacional del Cáncer, 2012).

Durante el periodo 2007-2011 se encontró que en la población adulta los linfomas no Hodgkin y las leucemias linfoides causaron un 0,9 % y 2,4% de las defunciones totales en personas de sexo masculino, respectivamente. En personas de sexo femenino los linfomas no Hodgkin causaron un 2,2% de los decesos y las leucemias linfoides un 0,8% (Atlas de Mortalidad por Cáncer 2009-2011, Instituto Nacional del Cáncer).

En la **Figura 3** se muestra la distribución geográfica de los casos de ambas patologías en la superficie nacional para el periodo 2007-2001.

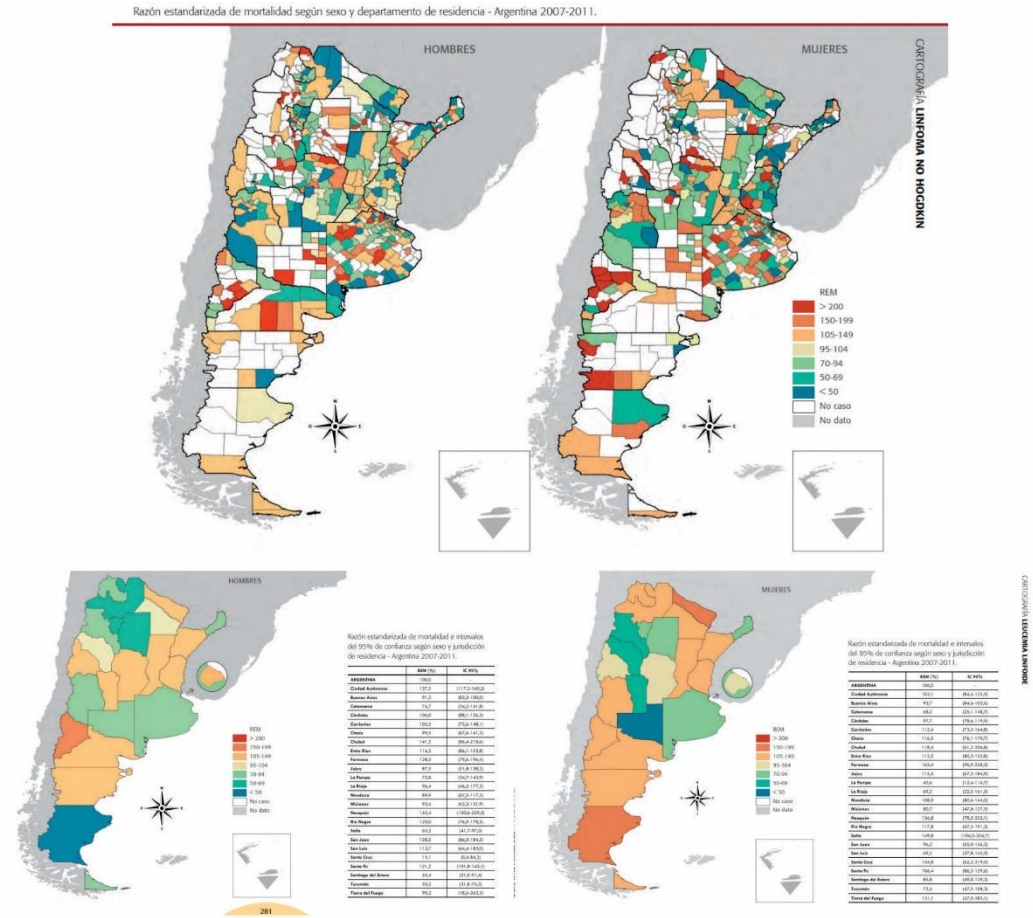


Figura 3. Distribución nacional de la mortalidad asociada a los diagnósticos de linfomas no Hodgkin y leucemias linfoides estratificadas por sexo biológico. Arriba: Mortalidad asociada a los linfomas no Hodgkin. Abajo: Mortalidad asociada a las leucemias linfoides. Izquierda: datos para personas de sexo masculino. Derecha: datos para personas de sexo femenino. Los valores representan la Razón Estandarizada de Mortalidad a nivel provincial y departamental. Imágenes extraídas del Atlas de Mortalidad por Cáncer 2009-2011, Instituto Nacional del Cáncer.

Tratamientos tradicionales actuales

Considerando los alcances de la actual tesis, la información de aquí en adelante será exclusiva para leucemias y linfomas cuya célula neoplásica son los linfocitos T.

En el caso de las leucemias linfocíticas agudas de tipo T (LLA-T), una vez confirmado el diagnóstico se lleva adelante un tratamiento que consta típicamente de regímenes de quimioterapia durante 2 o 3 años, que pueden ser combinados con radioterapia craneal (Raetz & Teachey, 2016). Para evitar el desarrollo de resistencias al tratamiento, el abordaje clínico se realiza en tres fases: inducción, consolidación y reducción (Lato et al., 2021). Los agentes utilizados para la primera etapa incluyen vincristina, corticosteroides y asparaginasa. En la segunda fase se utilizan otros quimioterapéuticos tales como mercaptopurina, tioguanina, metotrexato, ciclofosfamida, etopósido y citarabina (S. L. Cooper & Brown, 2015).

Finalmente, en la última etapa (mantenimiento) se utilizan metotrexato y mercaptopurina. La gran mayoría de los agentes quimioterapéuticos causan como efectos secundarios mielosupresión, mucositis, náuseas o vómitos. El tratamiento es menos intenso a medida que progresa la terapia, pero debe incluir una terapia dirigida al sistema nervioso central para asegurar su éxito, lo cual lo hace altamente invasivo (S. L. Cooper & Brown, 2015). Otro agente nuevo que se utiliza para LLA-T es la nelarabina, pero tiene efectos adversos muy potentes, como neuropatías periféricas o centrales, mareos, confusión, ataxia, convulsiones, alteraciones del humor y eventos hematológicos como neutropenia, anemia y trombocitopenia (Lato et al., 2021).

La propuesta terapéutica actual logra que el 90% de los pacientes ingresen en remisión de la enfermedad, pero la terapia requerida para lograr la cura es intensiva y presenta riesgos de generar toxicidades en forma aguda y tardía. Además, tiene un éxito relativamente bajo para tratar las recaídas, las cuales ocurren en los primeros 2 años del diagnóstico e implican una expectativa de supervivencia inferior al 25% (S. L. Cooper & Brown, 2015; Emadi & York Law, 2023) Las causas principales de las recaídas son principalmente la alta tasa de resistencias a las quimioterapias iniciadas por mutaciones nuevas, y la infiltración temprana que se observa en este tipo de patologías (Lato et al., 2021). Además, el impacto de los tratamientos a largo plazo en pacientes pediátricos puede generar problemas en el sistema reproductivo como infertilidad, alteraciones en los niveles de hormonas sexuales, demora en la pubertad, menstruaciones irregulares y menopausia prematura (*Canadian Cancer Society,* s.f.).

Ya se ha mencionado anteriormente que las LLC son menos agresivas y mortales que las LLA, y, además, luego del diagnóstico, el curso clínico de la enfermedad es muy heterogéneo. Algunos pacientes vivirán por décadas sin requerir tratamiento, mientras que otras personas requerirán tratamiento inmediato (Gribben & O'Brien, 2011). A pesar que los pacientes con diagnóstico de LLC poseen una baja tasa de mortalidad, esta enfermedad, hasta el día de la fecha, no se considera curable (Gomes et al., 2018).

Mientras que en la gran mayoría de las personas con diagnóstico de LLC las células cancerosas son los linfocitos B, hay casos de LLC que se originan en linfocitos T, también referido como Leucemia Pro-Linfocítica de Linfocitos T. Esta patología es considerada rara por su baja incidencia en la población, con 2 casos cada 1 millón de individuos, pero a pesar de ello, es la leucemia crónica T más frecuente en el mundo (Peña et al., 2016). El diagnóstico es clave para la prognosis, ya que el tratamiento es distinto al utilizado para otras enfermedades en las cuales las células T son cancerosas. Los tratamientos actuales no resultan típicamente en remisiones a largo plazo, a excepción de la realización de trasplantes

de células de médula ósea. Es por ello que se suele recomendar a los pacientes con dicho diagnóstico su participación en ensayos clínicos, de acuerdo con sus posibilidades (*Leukemia and Lymphoma Society*, s.f.).

Con respecto a los linfomas de tipo no Hodgkin, se suele utilizar quimioterapia combinando una serie de sustancias como ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina y prednisona o ciclofosfamida con etopósido. Otra opción terapéutica posible es la combinación de ciclofosfamida, doxorrubicina y prednisona en conjunto con el anticuerpo monoclonal brentuximab vedotina, que tiene como molécula blanco la proteína de superficie CD30. En estadios tempranos de la enfermedad, el tratamiento también puede constar de radioterapia en el sitio del linfoma. En casos en los cuales los pacientes no pueden soportar quimioterapias intensas, un solo ciclo de quimioterapia o inmunoterapia puede ser utilizada. Además, si el linfoma responde al tratamiento, puede que se recomiende un trasplante de médula ósea en caso de ser viable (*American Cancer Society*, s.f.). Con el uso de regímenes de tratamientos modernos, casi el 70% de los pacientes diagnosticados con linfoma no Hodgkin agresivos ingresan en remisión (National Cancer Institute, s.f.). Dado que este tipo de linfomas suelen ser difíciles de tratar, en determinados casos se pueden considerar formar parte de ensayos clínicos para probar tratamientos novedosos como opción terapéutica.

Propuestas terapéuticas alternativas

Teniendo en cuenta este contexto, resulta necesaria la implementación de terapias eficaces, específicas y seguras para mejorar el pronóstico de los pacientes con leucemias y linfomas T. En la actualidad hay varias investigaciones enfocadas en el desarrollo de terapias novedosas, más específicas y con menores efectos adversos, utilizando tecnologías de última generación, tales como: Modificación de los receptores de las células T (terapia CAR-T), activadores de células T biespecíficas (BiTEs) e inmunoterapias basadas en anticuerpos monoclonales (*National Cancer Institute*, s.f.).

Si bien dichos desarrollos son prometedores, al tratarse de enfoques personalizados en el paciente, son tecnologías de alto costo y complejidad. Además, el acceso a dichas terapias puede ser problemático en algunas regiones como por ejemplo en Argentina, de acuerdo con lo informado por la Sociedad Argentina de Hematología en su informe sobre Leucemias Agudas del año 2019. Sumado a esto, en los últimos años se han reportado evidencias de resistencias secundarias que se asumen que han sido inducidas en primera instancia a causa de determinados tratamientos CAR-T, que se encuentran patentados y en uso tras la aprobación de las autoridades regulatorias correspondientes (Lu & Jiang, 2022). Los mecanismos de resistencias pueden deberse a varios factores, comúnmente asociados

a las inmunoterapias, como falta de persistencia de las células CAR-T, depleción de los objetivos terapéuticos, pérdida antigénica e inducción de un microambiente tumoral tolerogénico (Lu & Jiang, 2022).

INMUNOLOGÍA Y VACUNOLOGÍA

Respuestas inmunológicas y su clasificación

El sistema inmune ha evolucionado para proporcionar un repertorio de reconocimiento amplio y afinado para antígenos propios y no propios que implica una interacción regulada entre las células presentadoras de antígeno (CPA) y los linfocitos T y B. Esta interacción facilita las vías efectoras inmunológicas específicas de los patógenos, la generación de memoria inmunológica y la regulación de la homeostasis inmune del huésped (M. D. Cooper & Alder, 2006).

A grandes rasgos, las respuestas inmunológicas se dividen entre humorales y celulares, dependiendo si las acciones observadas están mediadas por moléculas o por células. Los efectores de respuestas inmunes celulares incluyen a los linfocitos T, que maduran en el timo y las células productoras de anticuerpos (linfocitos B) que surgen en la médula ósea, entre otras. Después de desarrollarse en los órganos linfoides primarios (timo y médula ósea), se trasladan a órganos linfoides secundarios, incluidos los ganglios linfáticos y el bazo, donde aguardan para encontrar a los antígenos específicos que reconocen, en caso en que hayan ingresado al organismo y se encuentren circulando por la linfa y sangre, respectivamente (Murphy & Weaver, 2016).

Por otro lado, las respuestas inmunes se clasifican como innatas o adaptativas, dependiendo de las células o moléculas que están involucradas en las respuestas. Las respuestas adaptativas reciben ese nombre ya que los mediadores implicados se desarrollan a lo largo de la vida de un individuo, adaptándose a su historia previa de contacto con diferentes patógenos y por ello son altamente específicas. Por otro lado, las respuestas innatas se encuentran siempre presentes y listas para actuar, pero suelen ser inespecíficas ya que se reconocen patrones compartidos entre distintos patógenos. Mientras que casi todas las células del linaje mieloide se consideran parte de las respuestas innatas, las respuestas adaptativas son mediadas exclusivamente por los linfocitos T y B. Coordinando ambas respuestas se encuentran las células dendríticas, que son células presentadoras de antígeno profesionales (Murphy & Weaver, 2016).

Respuestas inmunológicas celulares

Durante los inicios de la inmunología se llamó antígeno a todas aquellas moléculas capaces de estimular la generación de anticuerpos (del inglés *antibody generation*), sin

embargo, actualmente el término antígeno se refiere a cualquier sustancia reconocida por el sistema inmunológico adaptativo. Típicamente los antígenos son proteínas, glicoproteínas y polisacáridos de patógenos, pero también pueden incluir una amplia variedad de compuestos químicos. Dado que los antígenos son significativamente más grandes que las regiones de unión al antígeno de los anticuerpos, los receptores reconocen únicamente a una porción específica del mismo, lo que se conoce como epitope (Murphy & Weaver, 2016).

A diferencia de la respuesta humoral, la respuesta celular utiliza distintos tipos de células para llevar a cabo sus mecanismos. Las CPA, como son los monocitos, macrófagos, células de Langerhans, células dendríticas, y linfocitos B, interactúan con los linfocitos T, tanto $CD4^+$ como $CD8^+$. Ambas clases de linfocitos portan un Receptor de Células T (TCR, del inglés *T- Cell Receptor*).

Para lograr una respuesta adaptativa eficiente, es necesaria la activación y posterior diferenciación de los linfocitos T hacia sus fenotipos efectores, los cuales dependen de los estímulos que reciben en su microambiente. Uno de los requerimientos del TCR para el reconocimiento del antígeno específico y la posterior activación del linfocito T, es la presencia de un complejo formado entre moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*) clase I o clase II, junto con el péptido a presentar. En este sentido, la carga de los péptidos en tales moléculas para formar los complejos es una etapa limitante del reconocimiento y posterior activación de los linfocitos T.

Las CPA capturan, procesan y presentan antígenos de diferente naturaleza con el objetivo principal de montar respuestas inmunológicas. Mientras que casi todas las células del organismo poseen moléculas de histocompatibilidad de clase I, sólo las CPA portan moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHCII).

Presentación de antígenos

El proceso de presentación de antígenos consta de la degradación de proteínas en su conformación nativa a péptidos y posteriormente la asociación de los mismos con moléculas del MHC clase I o clase II. En general, si las proteínas provienen del medio extracelular serán cargados en MHC clase II, y si provienen del interior celular, serán cargados en MHC clase I. Las moléculas de MHC clase I suelen unir péptidos cortos de 8-10 aminoácidos mediante ambos finales, mientras que las moléculas de MHC clase II deben ser de al menos 13 aminoácidos de largo pero los extremos no se encuentran interactuando con el bolsillo de la molécula, pero las interacciones ocurren en la región central de los péptidos. Los genes de MHC clásicos son uno de los más polimórficos en el genoma humano y se han identificado miles de diferentes alelos en el *loci* en el cual se encuentran codificados (Rock & Shen, 2005).

De acuerdo con el paradigma clásico de la inmunología, las células T CD4+ serán activadas tras el reconocimiento de su receptor con los antígenos unidos a MHCII, y las

células T CD8+ mediante la unión de su receptor con los antígenos unidos a MHCI. En este sentido, las funciones del sistema inmune estarían limitadas en dicho caso, ya que las CPA deberían estar infectadas con un patógeno intracelular como para activar células T CD8+ *naïve* y montar una respuesta inmune. Afortunadamente, existe un mecanismo alternativo mediante el cual las CPA presentan antígenos del medio extracelular en MHCI, el cual se denomina presentación cruzada. Las principales células que pueden realizar este tipo de presentación son las CPA profesionales, como las células dendríticas convencionales. Dichas células poseen diversos mecanismos de captura de antígenos extracelulares, siendo mayormente la fagocitosis o macropinocitosis (Rock & Shen, 2005).

El proceso de presentación de antígenos consta de diversos pasos: captura del antígeno en una vesícula, procesamiento del mismo y presentación en una molécula de MHC clase I o clase II, como se muestra en la **Figura 4**.

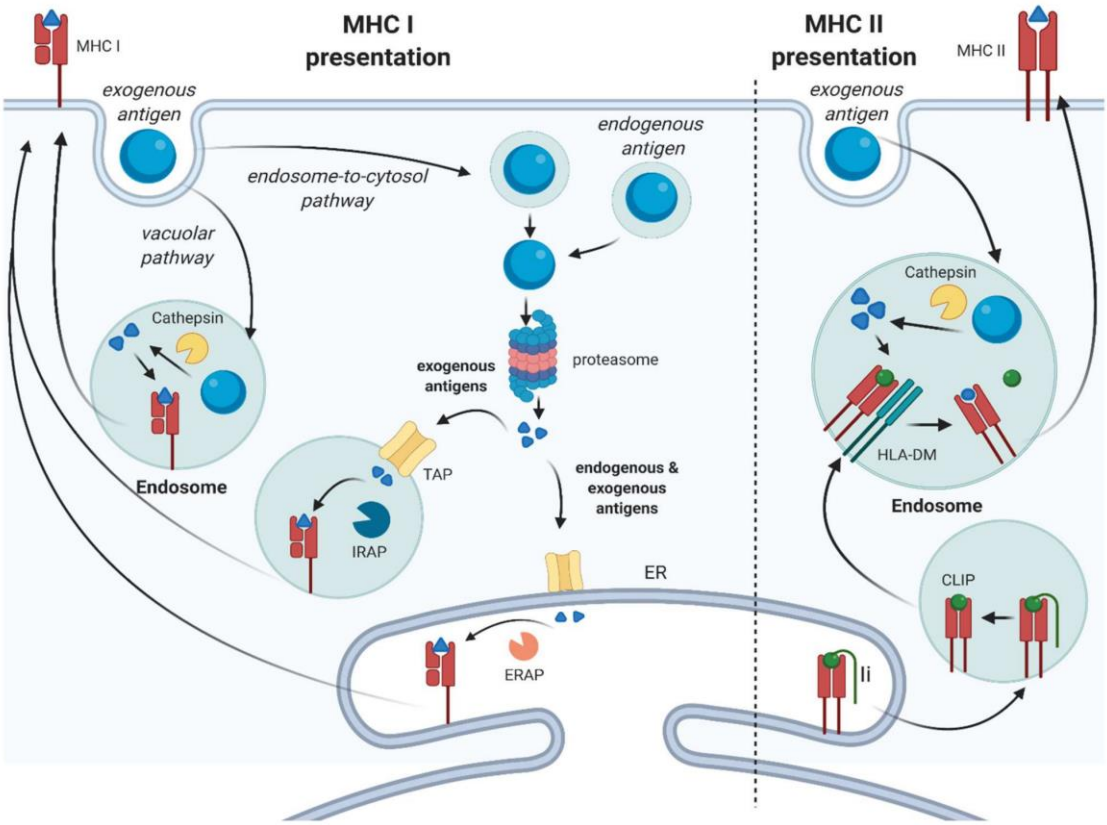


Figura 4. Proceso de internalización, procesamiento y presentación de antígenos. Izq: Se muestra la presentación en MHCI tanto mediante la vía clásica (antígenos internos en MHCI) como la vía de presentación cruzada (antígenos exógenos en MHCI). Der: Se muestra la presentación en MHCII (antígenos exógenos). La presentación clásica en MHCI implica el procesamiento de antígenos endógenos y su asociación con dicha molécula para ser presentada en la superficie celular. Por su parte, la presentación clásica en MHCII implica la captura de antígenos exógenos, su procesamiento y asociación con dichas moléculas que permitirán su presentación en la superficie celular. Por último, la presentación cruzada requiere la captura de antígenos exógenos, su procesamiento y asociación con moléculas MHCI para luego ser presentadas en la superficie celular. Extraído de Harryvan et al., 2022).

Linfocitos T

Los linfocitos T maduros y activos poseen una gran diversidad de funciones que dependen del perfil de diferenciación que han obtenido tras su activación. Como se mencionó anteriormente, los linfocitos T tienen su origen en el Timo, y una vez que las células se encuentran maduras, comienzan a circular por los órganos del sistema linfático para encontrarse con el antígeno que específicamente los activará mediante unión a su TCR. Para que los linfocitos T adquieran su perfil efector es necesario que reconozcan al antígeno en un contexto de MHC clase I o clase II (según dependa), se activen tras la interacción de diversas moléculas co-estimulatorias de las CPAs y posteriormente atraviesen procesos de proliferación y diferenciación al perfil efector final. Es muy importante el paso de diferenciación, ya que se estima que solo un 5% del repertorio total de los linfocitos es capaz de responder a los antígenos peptídicos convencionales, cantidad insuficiente para montar una respuesta inmunológica robusta. Una vez en su perfil efector, los linfocitos T abandonan los órganos linfoides y se dirigen a los sitios de infección para ejercer sus funciones, o a los tejidos linfoides para activar linfocitos B (Murphy & Weaver, 2016).

El receptor de los linfocitos T

A diferencia de la gran cantidad de variantes génicas que son heredadas de padres a hijos, la generación de los linfocitos T ocurre mediante procesos adicionales que otorgan mayor diversidad de secuencias. El receptor de linfocitos T (TCR) es un heterodímero compuesto por dos cadenas polipeptídicas: α/β o γ/δ (**Figura 5A**). Como puede observarse en la **Figura 5B**, los genes que dan lugar a la combinación final son 3: un segmento C (constante), un segmento V (Variable) y un segmento D (diversidad). En el caso de α, la cadena se compone tras la combinación de los segmentos V (variable) y J (unión), mientras que la cadena β cuenta también con segmentos D (diversidad).

La región Variable (V) de la cadena β permite la diferenciación de los linfocitos T en 30 familias Vβ en los seres humanos, dependiendo del re-arreglo que se produzca (Geest et al., 2015). A nivel proteico, cada cadena posee un dominio variable “V” en su región amino terminal, seguido de un dominio constante “C” que posee baja variabilidad, una región bisagra unida por un puente disulfuro a su contraparte, una región transmembrana hidrofóbica con cargas positivas y una región citoplasmática pequeña en el carboxilo terminal. En la **Figura 5C** se muestra que el dominio variable de cada cadena cuenta con *loops* que conectan hebras β y corresponden a regiones hipervariables en las que se concentra la variabilidad entre distintos TCR. Cada cadena cuenta con 3 de estas denominadas CDR (regiones determinantes de complementariedad) que reconocen antígenos asociados a moléculas presentadoras (Rossjohn et al., 2015).

Este proceso de rearreglos génicos ocurre en el timo durante la generación de dichas células y por lo tanto pueden producirse más de $2x10^7$ combinaciones diferentes (McLean-Tooke et al., 2008). Luego, en el timo atraviesan una prueba de auto-reactividad en la cual se eliminan los clones de linfocitos que reaccionan con antígenos propios del organismo para evitar fenómenos de auto-inmunidad (Murphy & Weaver, 2016).

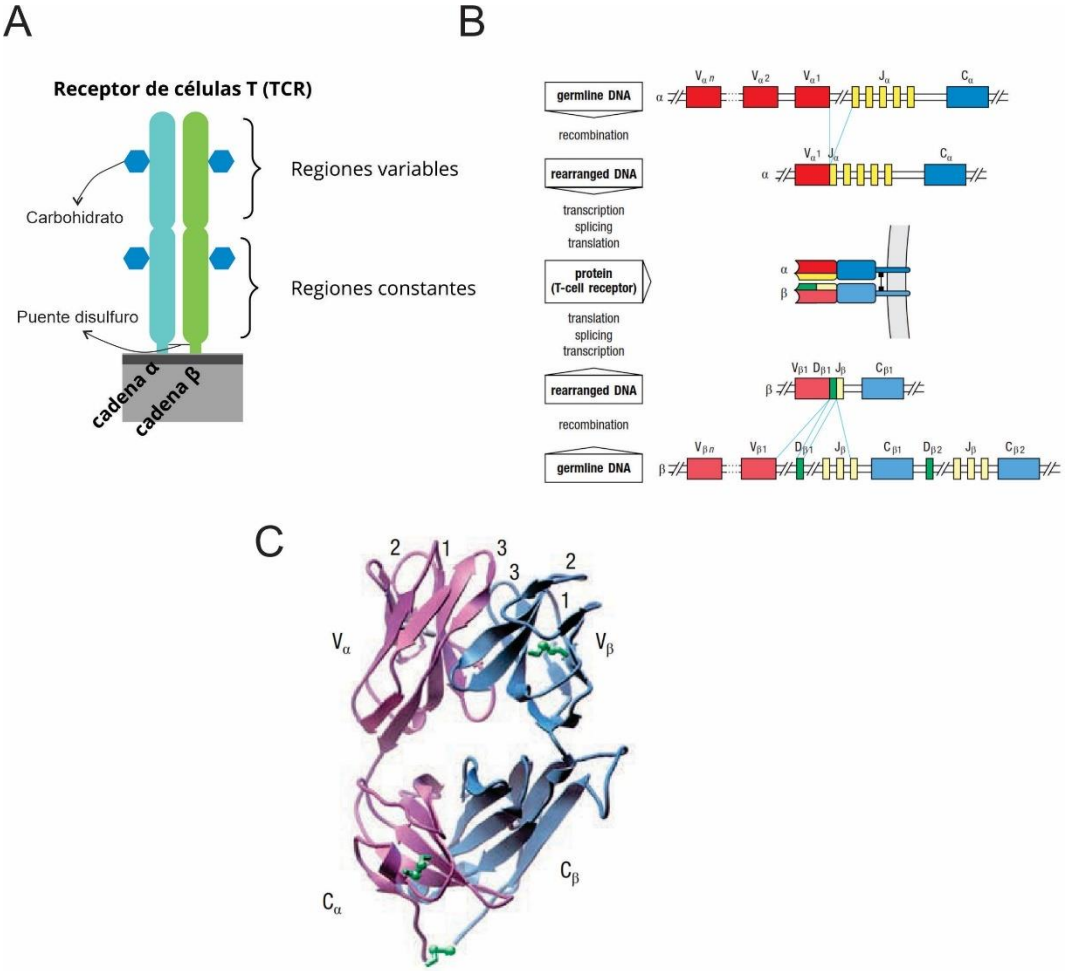


Figura 5. Estructura del TCR y mecanismo mediante el cual se genera. A. Representación gráfica de la composición del TCR. Se muestran las cadenas α y β con un detalle de todas sus regiones. Adaptado de Murphy & Weaver, 2016. **B. Mecanismo de rearreglos génicos para la generación de las cada una de las dos cadenas proteicas del TCR.** Extraído de Murphy & Weaver, 2016. **C. Estructura cuaternaria del TCR.** La cadena α se muestra en color rosa y la cadena β en azul mientras que los puentes disulfuro se muestran en verde. Se muestran los *loops* CDR cuya conformación forma los sitios de unión a antígeno (rotulados como 1, 2 y 3). Extraído de Murphy & Weaver, 2016.

Regiones variables de la cadena β del TCR

En seres humanos la región génica que codifica para las variantes Vβ del TCR se localiza en el cromosoma 7, brazo largo *locus* 34 y de acuerdo con la base de datos internacional ImMunoGeneTics information system (IMGT, https://www.imgt.org/), hay 68 genes reportados y 151 alelos totales. De esos 68 genes, 48 se reportaron como funcionales

y 18 son considerados pseudogenes ya que demuestran corrimientos del marco de lectura o defectos en las señales de recombinación, pero poseen alta homología con los genes funcionales (Giudicelli, 2004). Si se utiliza un 75% de similitud de secuencia como criterio, los 68 genes Vβ pueden ser divididos en 30 familias, cada una de las cuales contienen 1 a 9 miembros (Su & Nei, 2001). Utilizando la nomenclatura IMGT las variantes de los genes son designadas por su número en la familia correspondiente, seguida por un guion medio y un número indicando su localización relativa en el *locus* desde el 5' del locus, solo en caso en que haya varios genes que pertenezcan a un mismo subgrupo, como, por ejemplo: TRBV10-3. También hay genes huérfanos como Vβ22, que se encuentran codificados por fuera del *locus* habitual como por ejemplo en el cromosoma 9 y por lo tanto su secuencia no podrá recombinarse para dar lugar a receptores de TCR.

Vacunología y cáncer

La vacunología es un campo en constante crecimiento que inicialmente surgió en la búsqueda particular de la prevención de enfermedades causadas por microorganismos. Sin dudas la vacunación ha sido uno de los grandes logros que ha impactado en la reducción de la mortalidad humana y permitido que mejore la calidad y la expectativa de vida de las personas. Se estima que las vacunas han salvado la vida a un total de 154 millones de personas desde el año 1974 (Shattock et al., 2024).

Las vacunas profilácticas tienen el objetivo de prevenir el contagio o mitigar las formas graves de una determinada enfermedad, y lo hacen a través del entrenamiento del sistema inmunológico. Al presentarle a las células inmunes determinados antígenos característicos del agente que causa la patología, se espera lograr una respuesta inmunológica específica para montar un proceso de respuesta mejor y más rápido ante el encuentro con el patógeno verdadero. La vacunación le debe su éxito al fenómeno de la memoria inmunológica mediante el cual las células inmunes específicas contra determinados antígenos permanecen en el organismo por grandes periodos de tiempo, listas para reconocer a los agentes e iniciar una respuesta de defensa (Flint et al., 2015).

En el caso del cáncer, dado el origen de la enfermedad, no es posible poder dirigir una respuesta inmune contra las células transformadas sin iniciar una respuesta autoinmune. Sumado a esto, la aplicación masiva de vacunas profilácticas contra cáncer de origen no viral no se considera un abordaje viable, ya que existen más de 200 tipos de cáncer de causas diversas (Instituto Nacional de la Salud [NIH], 2018). Uno de los pocos casos exitosos al respecto de vacunología y cáncer es de la vacuna contra el Virus del Papiloma Humano, que es el principal causante del cáncer de cuello de útero, aunque el abordaje es contra antígenos del virus y no contra el cáncer en sí (Shapiro, 2022).

VIRUS–LIKE PARTICLES COMO PLATAFORMAS PARA EL DESARROLLO PROFILÁCTICO Y TERAPÉUTICO

Virus-like particles **(VLPs)**

En la actualidad existen una gran variedad de opciones para el desarrollo de vacunas, que a grandes rasgos se clasifican en 4 categorías: vacunas inactivadas o atenuadas, vacunas a subunidad, vacunas de vectores virales y vacunas de ácidos nucleicos. Dentro de las vacunas a subunidad se incluyen las vacunas basadas en partículas pseudovirales, o también llamadas *virus-like particles* (VLPs).

Las VLPs son estructuras que imitan la organización y composición de las partículas virales, pero carecen de material genético y por lo tanto no son infectivas ni replicativas. Esta cualidad las hace altamente seguras, mientras que poseen determinadas características que permiten activar el sistema inmune debido a su composición de proteínas virales, su tamaño y la alta repetitividad de los epitopes en su superficie. Se generan mediante autoensamblaje tras la expresión de proteínas de cápside o de matriz de diferentes virus en diversos sistemas de producción. Sumado a esto, son herramientas muy versátiles para adaptar las formulaciones rápidamente a nuevos antígenos debido a que se generan mediante sistemas heterólogos (Mohsen & Bachmann, 2022; Ruzzi et al., 2023).

Dadas sus características de baja peligrosidad, pero buena imitación de los sistemas naturales, las VLPs poseen una gran diversidad de utilidades, como herramientas para estudios de ciclo viral, interacciones de proteínas en los procesos de brotación viral y *delivery* de drogas, entre otros. De hecho, una gran cantidad de ensayos que tienen como fin caracterizar a virus peligrosos que no posean vacunas o tratamientos disponibles, tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o el virus del Ébola, se realizan con VLPs en lugar del virus en su forma salvaje, para evitar el uso de instalaciones de altos niveles de bioseguridad (Li et al., 2016; H. Wang et al., 2023).

Sin embargo, el mayor uso de las VLPs ha sido históricamente la generación de formulaciones vacunales para la prevención de enfermedades. Al día de la fecha numerosas vacunas profilácticas basadas en VLPs han sido patentadas y aprobadas para el uso en seres humanos, como, por ejemplo: Cervarix y Gardasil contra el Virus del Papiloma Humano, Mosquirix contra la malaria, GenHevac B y Bio-Hep-B contra la hepatitis B, Hecolin contra la hepatitis E y CircoflexTM contra el circovirus porcino tipo 2 (Guo et al., 2022; Jennings & Bachmann, 2008; Kushnir et al., 2012; Moradi Vahdat et al., 2021; Tariq et al., 2022; Yin et al., 2010). Sumadas a estas, existen muchas más en ensayos preclínicos y clínicos (Mohsen & Bachmann, 2022).

Con respecto al desarrollo de tratamientos oncológicos basados en VLPs, hay varios proyectos tanto profilácticos como terapéuticos que se basan en la inducción de la respuesta inmunológica contra determinados antígenos como, por ejemplo: HER-2 o péptidos derivados (Hu & Steinmetz, 2021; Palladini et al., 2018; Ruzzi et al., 2023) o IGF1R (Salazar-González et al., 2019). Incluso hay un desarrollo contra melanoma que atravesó las fases de ensayos clínicos fase I/II con resultados prometedores para el tratamiento de cáncer de piel utilizando VLPs que llevan en su interior ácidos nucleicos CpG tipo A (Goldinger et al., 2012).

La proteína Z del virus Junín

El Laboratorio de Virus Emergentes de la Universidad Nacional de Quilmes históricamente ha llevado adelante líneas de trabajo sobre el virus Junín (JUNV), agente etiológico de la Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) en seres humanos. Este virus pertenece a la familia *Arenaviridae*, género *Mammarenavirus* del Nuevo Mundo, y se encuentra dentro del clado B. Su nombre deriva de la ciudad bonaerense en la cual se detectaron los primeros casos de dicha enfermedad en Argentina. La FHA es una fiebre viral, hemorrágica, transmitida por roedores, y endémica en la región central de Argentina, específicamente en la pampa húmeda (Enria et al., 2008).

Con respecto a la estructura del virus, las partículas virales del género *Mammarenavirus* son pleomórficas, de un diámetro entre 50 y 300 nm, y contienen copias de las nucleocápsides circulares, incluyendo además una cantidad variable de ribosomas. Dichos viriones poseen una cubierta lipídica con proyecciones cilíndricas, adquirida durante el proceso de brotación. Su genoma está conformado por dos segmentos de ARN simple cadena, llamados S (*Small*, del inglés pequeño) y L (*Large*, del inglés grande) cuyos tamaños aproximados son de 3,5 kb y 7,5 kb, respectivamente. Cada uno de los fragmentos consta de dos marcos abiertos de lectura (ORF, del inglés *Open Reading Frame)* no solapados y orientados en sentidos opuestos, una estrategia de codificación denominada como ambisentido. Los ORFs se encuentran separados entre sí mediante la presencia de una región intergénica no codificante, la cual presenta una estructura secundaria estable en las predicciones bioinformáticas (**Figura 6A**).

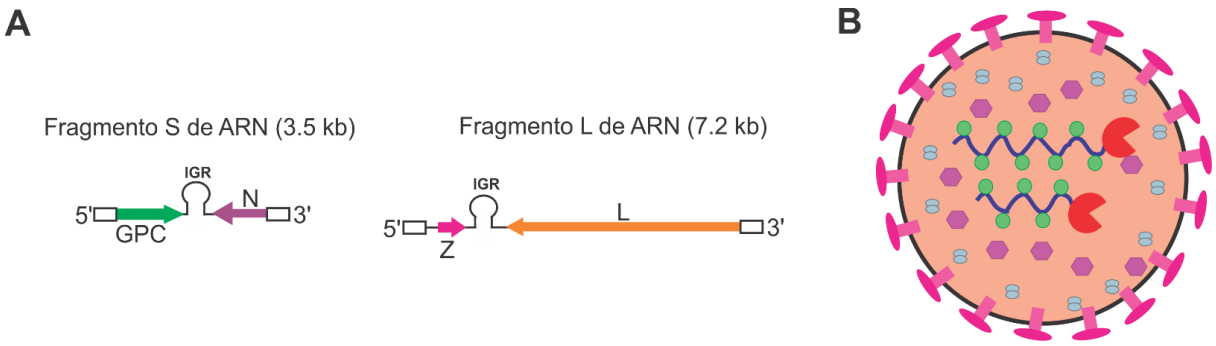


Figura 6. Esquema del genoma y del virión de los arenavirus. A. Diagrama esquemático de la estrategia ambisentido de los arenavirus. Las estructuras de *loop* indican las regiones no codificantes de cada fragmento genómico. Como consecuencia del arreglo genómico, los ORFs de GP-C y Z pueden ser transcriptos únicamente luego del inicio de la replicación del genoma viral. Basado en una figura perteneciente a Knipe & Howley, 2013. **B. Esquema representativo del virión típico de un arenavirus.** En coloración azul se muestran los dos fragmentos de ARN genómicos, el grande (superior) y el pequeño (inferior). El genoma se encuentra acompañado por nucleoproteínas, mostradas en verde y en el extremo 3' se encuentra una polimerasa de ARN, esquematizada color rojo. Además, se muestran en color celeste ribosomas y en color violeta, la proteína Z de matriz. En la superficie de la partícula se muestran glicoproteínas, mostradas en color fucsia. Basado en Sarute & Ross, 2017.

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, han descrito la funcionalidad clave de la proteína de matriz Z en el ciclo viral de JUNV, ya que se encuentra implicada en el proceso de brotación viral (Romanowski et al., 2017). La estructura de la proteína Z se encuentra dividida en tres dominios: la región N-terminal, con la presencia de una secuencia consenso para la miristoilación; un dominio central RING o *Zinc finger* (dedos de Zinc) que contiene dos iones de Zn^{+2}; y un extremo C-terminal en el cual se encuentran motivos ricos en prolina, llamados dominios tardíos (**Figura 7**). Mientras que el dominio central está compuesto por dedos de Zinc dándole el nombre a esta proteína, el dominio tardío impulsor del proceso de brotación (Strecker et al., 2003). Las mutaciones en éstos inducen el ensamblaje defectuoso de la progenie viral, de manera que los viriones nacientes son incapaces de separarse de la membrana celular. Además, dichos dominios pueden funcionar como unidades autónomas, es decir que son capaces de promover la brotación de los "partículas virales" aún expresados en un contexto proteico distinto y en posiciones no naturales dentro de una proteína (Bieniasz, 2006).

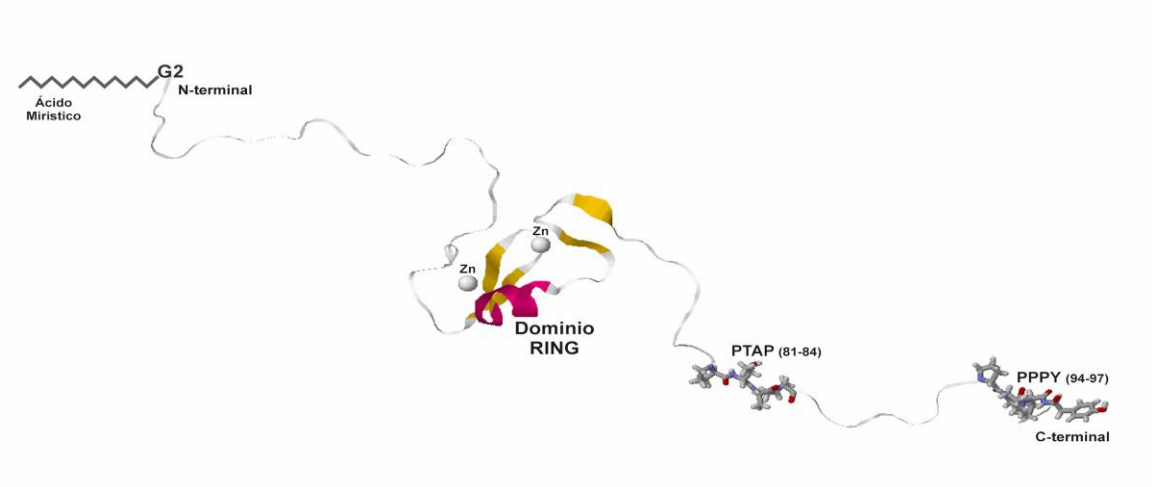


Figura 7. Estructura de la proteína Z del virus Lassa (cepa Joshia) obtenida por Resonancia Magnética Nuclear. Se muestran los componentes relevantes en la estructura de la proteína Z de un arenavirus. En el extremo N-terminal se destaca la presencia de una glicina en la posición 2, la cual es sustrato de la miristoilación. En la región central se indica el motivo RING en coordinación con dos iones de Zn^{+2} y finalmente en la región C-terminal se muestran los dos dominios tardíos (PTAP y PPPY) presentes en dicha proteína. Imagen extraída de Borio, 2013.

VLPs generadas a partir de la proteína Z de JUNV

Una de las características más interesantes de la proteína de matriz Z de los arenavirus, es su capacidad de generar vesículas brotantes en cultivos celulares, incluso en ausencia de la infección viral. La transfección de cultivos celulares con la construcción pZ, que posee los elementos para la expresión en células eucariotas, induce la producción de $VLPs_Z$ y dicha función se mantiene incluso cuando Z se encuentra fusionada a otras proteínas (Borio et al., 2012; Capul & de la Torre, 2008).

Trabajos previos en nuestro laboratorio llevaron adelante la caracterización de la expresión y función de la proteína Z de JUNV en cultivos celulares (Borio, 2008; Borio, 2013; Bergier, 2016; De Ganzó, 2017). Los resultados obtenidos mostraron que dicha proteína promueve la formación de VLPs en células de mamífero, demostrándose además que la maquinaria molecular de células de insectos también es capaz de reconocer las señales presentes en la secuencia de Z y permitir la brotación de VLPs (Borio et al., 2012).

A partir de los resultados obtenidos previamente se decidió explorar la capacidad de Z de JUNV para generar VLPs cuando se fusionan secuencias heterólogas en el extremo carboxilo. Esta estrategia fue denominada como sistema de vehiculización de antígenos, poniendo en evidencia el agregado de secuencias antigénicas en las construcciones moleculares. Para poder analizar el impacto de este agregado en la capacidad de brotación de Z, los ensayos se realizaron con la proteína *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP), y el plásmido recombinante que porta tal construcción se denominó pZ-eGFP. De esta forma,

se pudo comprobar que Z de JUNV mantiene la capacidad de inducir la brotación viral aún con una secuencia agregada a su extremo carboxilo. Es importante destacar que esta proteína de fusión se localiza en la cara interna de la membrana celular y por lo tanto en la región interior de las partículas, a las cuales se las denominó $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ (Borio, 2008). Los resultados obtenidos mostraron que las VLPs fueron capaces de inducir significativamente una mayor cantidad de anticuerpos séricos anti eGFP en comparación con los grupos control tras dos dosis de administración intramuscular y sin el agregado de adyuvantes en ratones BALB/c (Borio et al., 2012).

SUPERANTÍGENOS: ANTÍGENOS CON PROPIEDADES ÚNICAS

Superantígenos

Los superantígenos (SAgs) son moléculas de naturaleza peptídica que interactúan de forma no convencional con linfocitos T o B. A diferencia de los antígenos convencionales, los SAgs no se presentan en forma clásica, no sufren procesamiento intracelular en las células presentadoras de antígenos y en lugar de interactuar con las regiones variables de los receptores de linfocitos, la unión ocurre de forma lateral a otros componentes de tales receptores, como se muestra en la **Figura 8** (Santolaya, 1998). Su nombre se debe a la gran cantidad de linfocitos que pueden estimular: mientras que los antígenos convencionales pueden activar 1 de cada 10.000 linfocitos, los SAgs pueden activar 1 de cada 5 linfocitos del repertorio total de un organismo (Santolaya, 1998). Es así que los superantígenos son antígenos muy potentes, capaces de inducir una sobrecarga del sistema inmune y estimular hasta un 30% del repertorio de células T *naïve*. La interacción entre los SAgs y las células T pueden dar como resultado una gran variedad de respuestas, incluyendo anergia, inflamación, citotoxicidad, depleción de las células T reactivas y autoinmunidad (Hamdy & Leonardi, 2022).

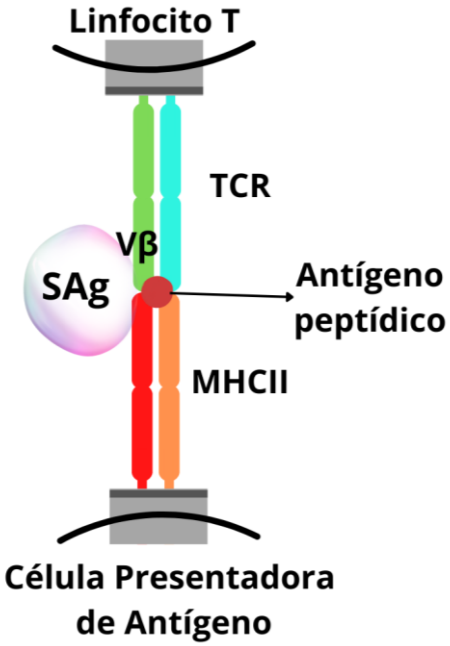


Figura 8. Interacción entre CPA y linfocitos T en presencia de superantígenos. La interacción entre los SAgs y los linfocitos T se encuentra sujeta a la presencia de MHC, por lo que se requieren CPAs. En lugar de cargarse en el surco del MHCII, el SAg interactúa en forma lateral tanto con dicha molécula como con el TCR, uniéndose a la región variable de la cadena β.

La interacción entre SAgs y linfocitos T presenta una especificidad que está dada por la cadena Vβ del clon linfocitario que reconozca un determinado superantígeno. Se sabe que las regiones CDR de la cadena β del TCR, típicamente asociadas con el reconocimiento de antígenos, no están involucradas en la unión a los SAgs. Luego de la interacción, los linfocitos atraviesan procesos atípicos como apoptosis o anergia de los clones reactivos. Las investigaciones al respecto, muestran que el efecto esperado depende del tipo y estado de maduración de las poblaciones de los linfocitos T. Cuando las células T $CD4^+$ o $CD8^+$ se encuentran inmaduras, puede causar la depleción de dichas poblaciones. Por otro lado, cuando dichas células se encuentran maduras, proliferan y producen una tormenta de citoquinas que causan que los linfocitos T ingresen a un estado de anergia (Deacy et al., 2021).

Superantígenos bacterianos y virales

Los SAgs pueden clasificarse con respecto a su origen, en bacterianos y virales. También pueden dividirse respecto a su capacidad para interaccionar con linfocitos T o linfocitos B. Desde su descubrimiento en la década de 1980, los SAgs han sido objeto de estudio de diversas investigaciones, pero particularmente los de origen bacteriano, por su implicancia en salud pública (Proft & Fraser, 2003). Hasta el momento, los SAgs mejor

caracterizados son los producidos por *S. aureus* y *S. Pyogenes* (Noli Truant et al., 2022). Los superantígenos bacterianos son toxinas que pueden causar la muerte de seres humanos en diversas patologías, como la toxina del síndrome de shock tóxico (TSST-1) producida por la bacteria *Staphylococcus aureus* y otras toxinas pirogénicas como las toxinas de la escarlatina causada por *Streptococcus pyogenes* serotipos A, B y C (Schlievert, 1993). A pesar de lo que podría pensarse normalmente, la intensa estimulación del sistema inmunológico causada por los SAgs, puede permitir la diseminación de las bacterias que causan determinada infección en forma más exitosa en lugar de favorecer su erradicación del organismo (Noli Truant et al., 2022).

Sobre los SAgs bacterianos, se conoce prácticamente todo el mecanismo de acción, las regiones de unión, las células implicadas e incluso las estructuras cristalizadas de la unión entre los mismos y las moléculas de MHC (Proft & Fraser, 2003). También se han determinado exactamente cuáles son los clones de linfocitos que comienzan un proceso de proliferación seguida de apoptosis entre 48 y 96 horas post-interacción con cada uno de los superantígenos de forma específica en lo que respecta a la cadena Vβ implicada (Noli Truant et al., 2022). Por ejemplo, *Staphylococcal Enterotoxin E* (SEE), un SAg derivado de *S. aureus* posee una especificidad de los Vβ: 5.1, 6.3, 6.4, 6.9, 8.1.

Por otro lado, los superantígenos de origen viral poseen una limitada descripción de los mecanismos mediante los cuales actúan. Entre los diversos virus que poseen superantígenos pueden destacarse el Virus de la Inmunodeficiencia Humana, el Virus del Ébola, el Virus de la Rabia y el Virus del Tumor Mamario Murino (Huber et al., 1996; Us, 2016). Durante el año 2022, se reportó que en algunos individuos el virus SARS-CoV-2 portaba algún componente que generaba un efecto "*superantigen-like*" por las presentaciones clínicas observadas en algunos pacientes. Específicamente, algunos individuos que sufrían COVID prolongado manifestaban síntomas observados típicamente en condiciones de autoinmunidad, tales como Lupus Eritematoso Sistémico, autoanticuerpos y anticuerpos antinucleares (Deacy et al., 2021).

Los superantígenos virales permanecen aún hoy en día como una gran incógnita con respecto a sus mecanismos de acción, y de hecho se desconocen tanto la estructura cristalizada como la especificidad de clones reactivos para la gran mayoría de los mismos. Efectivamente, hubo varios reportes de patogénesis causada por SAgs virales en seres humanos como por ejemplo derivados del *Human Endogenous Retrovirus* (HERV) y el virus de Epstein-Barr, pero hay varias discrepancias relacionadas con la falta de reproducibilidad de los resultados reportados por distintos grupos.

EL VIRUS DEL TUMOR MAMARIO MURINO Y SUS SUPERANTÍGENOS

Virus del Tumor Mamario Murino (MMTV)

El virus del Tumor Mamario Murino (MMTV) es un virus que pertenece a la familia *Retroviridae,* género *Betaretrovirus*. Anteriormente, el MMTV fue conocido como el virus Bittner, y también como el factor de la leche, ya que puede transmitirse verticalmente mediante la presencia de partículas virales en la leche (Parisi et al., 2022). El MMTV es un retrovirus cuyos viriones muestran una morfología de tipo B con espigas prominentes en la superficie de las partículas virales cuyo diámetro aproximado es de 105 nm (**Figura 9A**). Su genoma es de ARN simple cadena de sentido positivo, posee un tamaño de 9 mil pares de bases y al igual que el resto de los retrovirus, porta secuencias repetidas en la región terminal (LTRs, por *long terminal repeats*) en los extremos 3' y 5' cuando se encuentra en su estadio proviral (**Figura 9B**). A partir del genoma del MMTV se generan al menos 5 transcriptos mediante *splicing* alternativo (**Figura 9C**). La hebra de ARN que comienza en el 5' *Long Terminal Repeat* (LTR) y termina en el 3' LTR sirve como genoma que se empaqueta en las partículas virales (Ross, 2010).

Los LTRs de MMTV son particularmente largos (tamaño aproximado 1.3 kp de bases), porque codifican para dos genes adicionales mediante *splicing* alternativo del ARN mensajero: un superantígeno y REM (*Regulator of Export of MMTV mRNA*). Los superantígenos son proteínas accesorias virales no estructurales que se encuentran ausentes en otros miembros del mismo género. La codificación del gen SAg en los LTRs implica que su expresión sea tejido específico mediante la presencia de factores de transcripción que potencian o inhiben la expresión de dichos genes por unión a regiones puntuales de los LTRs (Parisi et al., 2022).

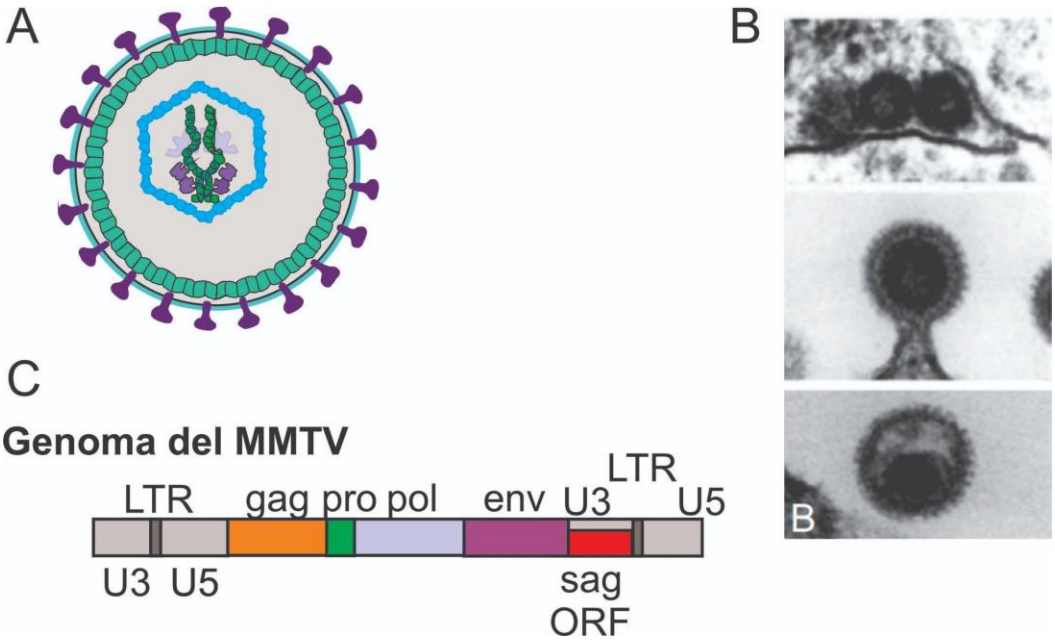


Figura 9. Viriones del MMTV. A. Esquema representativo de las partículas virales del MMTV. Las partículas se encuentran conformadas por el genoma, empaquetado junto con la nucleoproteína y la proteína de envoltura representada en color violeta que les da estructura a los viriones**. B. Imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) del MMTV.** Fotografía extraída de MacLachlan & Dubovi, 2011. **C. Estructura del genoma de MMTV.** Se muestran todas las regiones del genoma, incluyendo los dos LTRs en sus extremos, así como las regiones codificantes para las proteínas gag, pro, pol, env y el ORF del SAg.

Transmisión del MMTV

Anteriormente se discutió sobre el descubrimiento del MMTV y su transmisión a través de la leche murina, también llamada exógena. Este tipo de transmisión puede ocurrir incluso en el caso de nodrizas que amamanten a crías que no sean de su descendencia.

Además, dada su naturaleza de retrovirus, el MMTV es capaz de insertar su genoma viral en el ácido desoxirribonucleico (ADN) de las células hospedadoras y la iniciación de tumores es dependiente de ciclos hormonales que estimulan la división de las células del epitelio mamario y múltiples integraciones del genoma viral. El proceso oncogénico se ve promovido por la presencia de activadores de la transcripción de los genes integrados, observándose una mayor incidencia de cáncer con mayor cantidad de embarazos y lactancias en modelos murinos (Dudley et al., 2016; Ross, 2010).

Una vez integrado en el genoma, la transmisión de los provirus ocurre mediante herencia mendeliana hacia la progenie. Todas las cepas de ratones endocriados conservan una o más de dichas secuencias provirales de distintas variedades de MMTV, lo que se conoce como transmisión endógena (**Tabla 1)**. La mayoría de las secuencias provirales no codifican para virus con capacidad infecciosa o son transcripcionalmente inactivos, pero hay tres cepas de ratones (DBA, C3H y GRS) que poseen un *loci* llamado Mtv1 y Mtv2 que codifica

para virus infecciosos (MacLachlan & Dubovi, 2011). Hasta el momento se identificaron al menos 10 variantes de MMTV exógenas y 30 endógenas (Dudley et al., 2016).

Cepa de ratón	Cepas de MMTV	Poblaciones delecionadas
AKR	mtv-7, mtv-8, mtv-9, mtv-17, mtv-23	Vβ5, Vβ6, Vβ7, Vβ8.1, Vβ9, Vβ11 y Vβ12
BALB/c	mtv-6, mtv-8, mtv-9	Vβ3, Vβ5, Vβ11 y Vβ12
C57BL/6	mtv-8, mtv-9, mtv-17	ninguna, por ausencia de moléculas I-E
C3H/HeJ	mtv-1, mtv-6, mtv-8, mtv-11, mtv-14, MMTV-C3H	Vβ3, Vβ5, Vβ11 y Vβ12
DBA/2	mtv-1, mtv-6, mtv-7, mtv-8, mtv-11, mtv-14, mtv-17	Vβ3, Vβ5, Vβ6, Vβ7, Vβ8.1, Vβ9, Vβ11 y Vβ12

Tabla 1. Cepas de ratones endocriados y portación de cepas de MMTV endógenas. Se muestran las cepas de ratones endocriados más utilizadas en la actualidad, junto con las cepas de MMTV que porta cada uno y como consecuencia, las poblaciones delecionadas del repertorio de linfocitos de dichos organismos. Modificado de Hodes & Abe, 1996.

Existen hipótesis que indican que las secuencias de los SAgs han sido conservadas insertadas en los genomas murinos porque brindan una ventaja evolutiva, como por ejemplo evitar que los individuos sean susceptibles a determinado virus exógeno por carecer de los clones linfocitarios necesarios para el ciclo viral, como se ilustra en la **Figura 10** (Cho et al., 1995; Nepomnaschy, Buggiano, Goldman, & Piazzón, 1997). De esta forma, los SAgs endógenos confieren protección específica contra un MMTV infeccioso y de esta forma, otorga una ventaja para dicha población de ratones. Sin embargo, la existencia de un SAg endógeno trae como consecuencia una alteración del repertorio de los linfocitos T del individuo que podría resultar en una reducción de la respuesta inmune ante la presencia de cualquier patología. Además, al portar secuencias remanentes del resto de las proteínas virales de MMTV, podría implicar una menor eficacia para responder ante la infección con un MMTV exógeno diferente (Held et al., 1993).

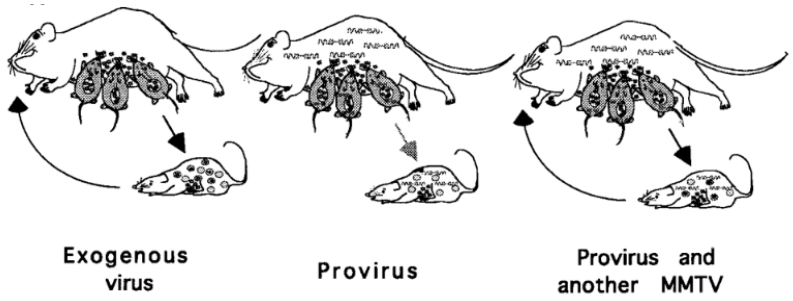


Figura 10. Tipos de transmisión del MMTV. Izquierda: Transmisión exógena. La ratona nodriza es portadora de un virus exógeno de MMTV por lo que transmitirá el mismo a los ratones a través de la leche. Centro: Transmisión endógena de MMTV. La ratona posee integrado en su genoma el provirus que codifica para determinado MMTV y lo transmitirá a su descendencia sin importar su lactancia. Derecha: Combinación de las dos vías de transmisión. Este caso ocurre cuando la ratona es portadora de un virus exógeno de MMTV y además posee integrado un provirus en su genoma. Por esa razón, sus crías portarán tanto el provirus en su genoma como el virus exógeno si fueran alimentadas mediante lactancia. Extraído de Huber et al., 1996.

MMTV en seres humanos ¿Un viejo enemigo?

Cabe destacar que el término MMTV es el que se utiliza por consenso, pero el virus no solo infecta ratones ni tampoco únicamente a glándulas mamarias. En este sentido, se ha referido a los efectos del MMTV en humanos como virus MMTV-*like*, betaretrovirus humano y virus del tumor mamario humano (HTMV).

Al respecto, hubo reportes en 1971 en el cual se demostró la presencia de partículas virales físicamente idénticas a las del MMTV en muestras de leche materna humana mediante microscopía electrónica de transmisión (Moore et al., 1971). Además, se demostró que el MMTV se puede integrar al azar en el genoma humano en experimentos *in vitro* y se han encontrado integraciones del MMTV *in vivo* en un contexto de enfermedad hepática (W. Wang et al., 2015). Otro trabajo encontró secuencias de dicho virus en material dentario de esqueletos de 4500 años de edad encontrados en el mediterráneo (Bevilacqua, 2022).

Luego de dichos resultados, comenzaron a impulsarse proyectos que investigaban la relación entre MMTV y cáncer de mama. Considerando 41 estudios en 19 países distintos se encontró una positividad del 35% en muestras de cáncer de mama contra un 2% de las muestras de voluntarios sanos. Sin embargo, esto ha sido controversial y cuestionado ya que el MMTV no pudo ser identificado en 11 estudios independientes. Hay una discusión en la comunidad científica al respecto porque la carga viral suele ser muy baja y eso puede dificultar la detección del virus (Lawson & Glenn, 2022). Hay autores que no coinciden con dicha explicación y que proponen que los resultados obtenidos se deben a contaminación con muestras murinas ya que no pueden reproducir los hallazgos (Perzova et al., 2017).

Respecto de los mecanismos de transmisión del MMTV entre seres humanos, se propone que ocurre mayormente mediante la saliva. Las secuencias de los genes de MMTV se encontraron presentes en la saliva del 27% de los niños sanos, 11% de los adultos sanos y en un 57% de pacientes de cáncer de mama. Las secuencias del MMTV se han identificado en las glándulas parótidas humanas, que son las glándulas que producen saliva. No hay evidencias sobre el posible mecanismo de transmisión, pero se ha postulado que las estructuras linfáticas en la boca y nariz de los seres humanos pueden ser posibles puntos de ingreso del MMTV, como las amígdalas y los adenoides (Lawson & Glenn, 2022). Se ha encontrado que los perros y gatos pueden infectarse de MMTV y por lo tanto se propone que la transmisión hacia los humanos sea mediante la convivencia con animales de compañía (Parisi et al., 2022).

Superantígenos del MMTV

Los superantígenos del MMTV son glicoproteínas transmembrana no estructurales que desempeñan un papel esencial en el ciclo viral reclutando linfocitos en el tracto gastrointestinal para facilitar la diseminación del virus a otras regiones del organismo una vez que estos han sido infectados (Acha-Orbea & MacDonald, 1995). Además de su participación en el ciclo viral, estas proteínas actúan como superantígenos específicos de linfocitos T, induciendo su activación y posterior apoptosis en los clones linfocitarios reactivos.

Mientras que las moléculas de MHC tienen relación directa con el rechazo ante trasplantes, los superantígenos fueron descritos inicialmente como *Minor lymphocyte stimulatory (Mls) antigens*, ya que no causaban rechazo de trasplante de piel en experimentos *in vivo,* pero eran capaces de estimular linfocitos T *in vitro* tan fuerte como los antígenos asociados a MHC (Huber, 1992). Inicialmente comenzaron a nombrar a los Mls como a, b, c y d, ya que se pensaba que estaban codificados por diferentes alelos de un mismo gen. Luego, se descubrió que la variante a era el producto de un único gen que se encontrada en la región distal del cromosoma 1 murino y los fenotipos d resultaban de la expresión conjunta de a y c. Además, se mostró que varios genes independientes causaban un fenotipo c, por lo que cambió la nomenclatura utilizando números en el orden de descubrimiento. Con el avance de la genómica se observó que los fenotipos Mls se correspondían con integraciones provirales: Mls-1 se asociaba con la presencia del mtv-7 y el fenotipo Mls-c se asociaba con la presencia de mtv-1, mtv-3, mtv-6 y mtv-13, dando como resultado un nuevo cambio en la nomenclatura de los superantígenos de MMTV (Huber, 1992).

Dependiendo de la cepa del MMTV se puede observar depleción total o parcial de los clones linfocitarios reactivos al SAg, lo que se resume en la **Tabla 2**.

Variante de MMTV	Tipo de SAg	Tipo de Depleción	Especificidad en ratones
MMTV-C3H	exógeno	Incompleta	Vβ14, Vβ15
BALB/cv	exógeno	Incompleta	Vβ2
mtv-7	endógeno	Completa	Vβ6, Vβ7, Vβ8.1, Vβ9
MMTV-SW	exógeno	Incompleta	Vβ6, Vβ7, Vβ8.1, Vβ9

Tabla 2. Características los superantígenos de MMTV más relevantes. Se muestra en nombre de cada variante, su naturaleza en función de la forma de transmisión, el tipo de depleción que causa y las variantes de Vβ que afecta. Basado en Hodes & Abe, 1996 y Ross, 2010.

La secuencia aminoacídica de los SAgs de MMTV consta de al menos 3 regiones, componiéndose de una región transmembrana, un dominio RARR, sitios de N-glicosilación, un dominio RKRR y finalmente una región polimórfica en el extremo 3´ (**Figura 11**). A pesar de ello, la estructura de los SAgs de MMTV es una predicción ya que ninguno de los mismos se encuentra cristalizado (C. G. Park et al., 1995).

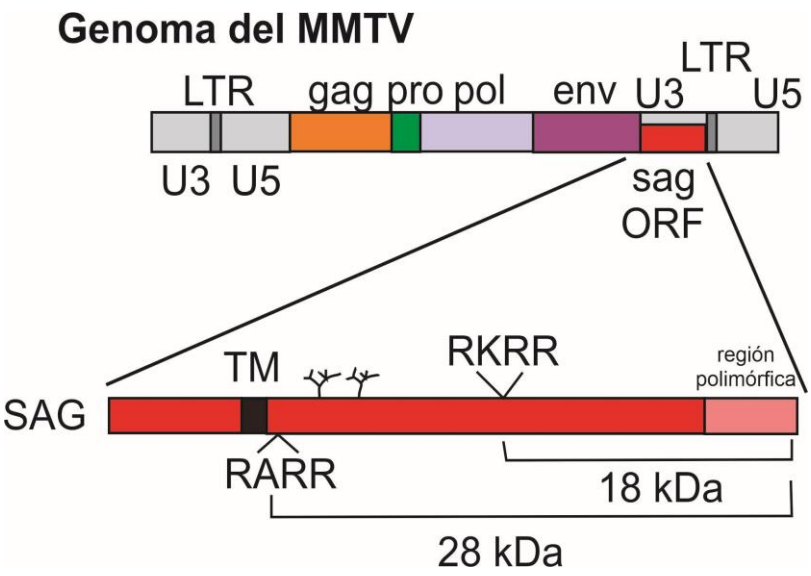


Figura 11. Estructura del genoma de MMTV y de la secuencia que codifica para el superantígeno. Se muestran los diversos dominios de la proteína, como el dominio transmembrana cercano al extremo amino terminal, la secuencia RARR de reconocimiento de proteasas, el sitio susceptible de N-glicosilación, la secuencia RKRR de reconocimiento de furina y la región polimórfica en el extremo carboxilo terminal. Adaptado de Winslow et al., 1992.

Antecedentes del Instituto de Leucemia Experimental

El grupo de investigación liderado por la Dra. Isabel Piazzón investigó por varios años la implicancia de los superantígenos bacterianos y virales sobre linfocitos T y B. Una de las líneas de investigación constó de la detección y caracterización de virus MMTV exógenos en distintas cepas de ratones presentes en el Bioterio del Instituto, realizando aportes significativos al área de estudio (Buggiano et al., 1999, 2001, 2002; Burzyn et al., 2004; Czarneski et al., 2002; Golovkina et al., 1997; Nepomnaschy, Buggiano, Goldman, Deroche, et al., 1997; Nepomnaschy, Buggiano, Goldman, & Piazzón, 1997; Qin et al., 1999). Luego de caracterizar la actividad biológica de los mismos sobre linfocitos tanto *in vitro* como *in vivo*, investigaron la posibilidad de aprovechar las propiedades del MMTV para el tratamiento de leucemias y linfomas.

Siguiendo con esa línea, se ha demostrado que el uso de leche portando virus exógenos de MMTV causa la depleción total de determinadas poblaciones de linfocitos T reactivos, como se observa en la **Figura 12**.

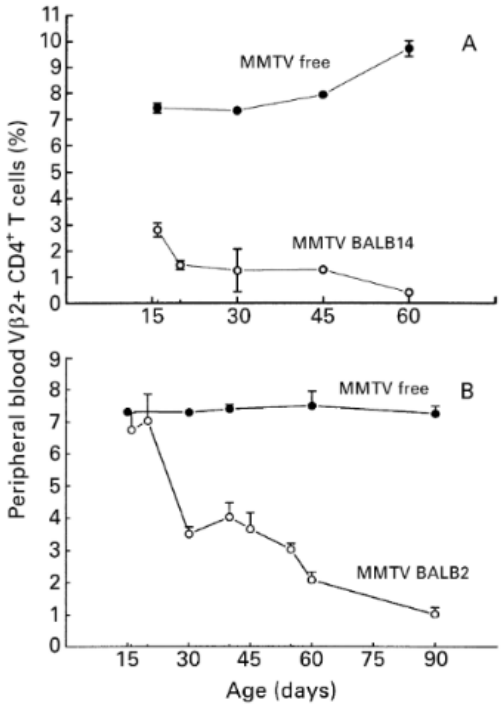


Figura 12. Depleción de las poblaciones de linfocitos T reactivas a distintos superantígenos. Se muestra el porcentaje de poblaciones de linfocitos T CD4+ Vβ14 y Vβ2 en sangre periférica de ratones en función de los días de lactancia con leche que porta virus exógenos (BALB14 o BALB2), en comparación con leche libre de virus. Figura extraída de Buggiano et al., 1999.

Debido a que se ha descrito que el superantígeno es el responsable de dicho efecto, en esta tesis doctoral se presenta un abordaje biotecnológico, explorando el diseño y desarrollo de tratamientos contra leucemias y linfomas basados en la actividad biológica de los superantígenos de MMTV.

En este sentido, abordamos aquí varias estrategias para el uso de cuatro superantígenos de MMTV: en su forma libre como subunidad, vehiculizados en VLPs derivadas de la proteína Z de JUNV, vehiculizados en VLPs del bacteriófago AP205 y finalmente mediante el uso de un sistema de nanojaulas sintéticas.

CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La implementación de terapias novedosas para leucemias y linfomas de linfocitos T, basadas en los superantígenos virales de MMTV que presentan la capacidad de inducir apoptosis específica, constituye un abordaje terapéutico complementario, con el objetivo de reducir los efectos secundarios de los tratamientos quimioterapéuticos.

OBJETIVO GENERAL

Investigar el potencial de los superantígenos virales de MMTV en el tratamiento de leucemias y linfomas de linfocitos T, con el fin de explorar nuevas estrategias terapéuticas que puedan reducir los efectos secundarios de los tratamientos convencionales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar las VLPs derivadas de la proteína Z del virus Junín como plataforma para el *delivery* de antígenos utilizando un antígeno modelo.
2. Vehiculizar los SAgs en VLPs derivadas de la proteína Z del virus Junín y evaluar la eficacia del sistema.
3. Expresar los SAgs de MMTV como subunidades en un sistema de expresión basado en bacterias.
4. Caracterizar la actividad biológica de las VLPs portando los SAgs y los SAgs libres utilizando líneas celulares neoplásicas y muestras de dadores sanos.
5. Vehiculizar SAgs de MMTV en VLPs producidas en sistemas de expresión bacterianos.

SECCIÓN II: MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS COMPARTIDOS ENTRE TODOS LOS CAPÍTULOS

Técnicas de biología celular y molecular

Cultivo celular

Materia viva

Para llevar a cabo la caracterización del sistema de expresión y la producción de VLPs se utilizó la siguiente línea celular:

- ✓ *Human Embryonic Kidney* (HEK) 293T: Contienen el antígeno T de *Simian Virus 40* (SV40), lo que genera la replicación de los plásmidos transfectados que poseen el origen de replicación SV40 y por lo tanto aumenta la expresión de las secuencias clonadas. Su perfil STR (*Short Tandem Repeat,* del inglés Repeticiones Cortas en tándem) es el siguiente: CSF1PO: 11,12; D13S317: 12,14; D16S539: 9,13; D5S818: 8,9; D7S820: 11; TH01: 7, 9.3; TPOX: 11; vWA: 16,19; Amelogenin: X (https://www.atcc.org/).

Mantenimiento de líneas celulares

Las células eucariotas utilizadas para la expresión de antígenos heterólogos fueron las HEK 293T, las cuales son adherentes. El medio de cultivo utilizado fue *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) completo, Las células se mantuvieron en estufa gaseada (Sanyo MCO-18AIC), a 37°C y con una inyección de CO_2 del 5%. Los frascos (BIOFIL) y placas de 6, 24 y 96 pocillos (BIOFIL) utilizados poseen un tratamiento específico para células adherentes. Los volúmenes de medio utilizados fueron los suficientes como para cubrir la monocapa celular de acuerdo al tamaño del frasco de cultivo y las células se repicaron a una confluencia aproximada entre 70% y 80% del total de la superficie del frasco. Se utilizaron células cuyos números de repiques se encontraban entre 2 y 15. Además, se confirmó la ausencia de diversas especies de *Mycoplasma spp.* en los sobrenadantes de cultivo de las células utilizadas mediante *Polymerase Chain Reaction* (PCR) en tiempo final a cargo del personal técnico de la Unidad ABioS de la Planta de Servicios Biotecnológicos de la Universidad Nacional de Quilmes.

La conservación de las células se llevó a cabo mediante congelado de las mismas suspendiendo los *pellets* correspondientes en medio de congelado y trasvasando a crioviales estériles (Corning) adecuadamente rotulados. Para el proceso de congelado los viales se colocaron en un recipiente de congelación Mr. Frosty (Nalgene) que se incubó a -80°C durante al menos 24 horas. Posteriormente, los viales fueron bien almacenados a -80°C a corto plazo o transferidos a tanques de nitrógeno líquido (-196°C).

Transfección de células eucariotas animales

La transfección con las construcciones plasmídicas se llevó a cabo siempre sobre cultivos celulares con una confluencia entre 50% y 70% del total de la superficie disponible. Tanto antes, durante como luego de la transfección las células fueron incubadas con medio de cultivo DMEM 2% (ver anexo) y en estufas de cultivo gaseadas (Sanyo), a 37°C y una inyección de 5% de CO_2.

El reactivo de transfección utilizado fue PEI87K, adquirido al Departamento de Química Orgánica, perteneciente a la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Buenos Aires (prestación de servicio N°21463). El protocolo fue seguido de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En forma concisa, el procedimiento requiere la preparación de 2 mezclas: por un lado, una solución de medio DMEM sin SFB, antibiótico ni antimicótico con la cantidad de polietilenimina (PEI) correspondiente, y por otro lado se prepara el ADN a transfectar (**Tabla 3**). Ambas soluciones se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego se mezclan, vertiéndose finalmente sobre la monocapa celular. Para el último paso no es necesario retirar el medio de cultivo y además el mismo puede contener antibiótico, antimicótico y SFB de acuerdo con su uso rutinario.

Placa de cultivo	DMEM	PEI	ADN
T175	1750 µL	81,6 µL	46,6 µg (máximo)
T75	750 µL	35 µL	5-20 µg
T25	250 µL	11,7 µL	1,7-6,7 µg
Placa P60	210 µL	9,8 µL	1,4-5,6 µg
Placa de 6 pocillos	100 µL	4,7 µL	0,7-2,7 µg

Tabla 3. Cantidades de cada reactivo para las mezclas de transfección. Como controles de los ensayos de expresión siempre se utilizaron: pZ-eGFP como control positivo y *mock* como control negativo (sin molde, pero en presencia de PEI).

Expresión y recolección de sobrenadantes

Luego de la transfección, se incubaron las células durante 48 horas a 37°C y una inyección de 5% de CO_2, dando lugar a la expresión de los genes heterólogos. Posteriormente se obtuvieron imágenes de los cultivos mediante microscopía de fluorescencia de los cultivos celulares utilizando el equipo *Cytation* 5 (Biotek), para corroborar la expresión de eGFP que siempre se utilizó como control positivo. A modo de determinar la eficiencia y especificidad de expresión, se tomaron imágenes de un mismo campo visual de los cultivos celulares tanto en campo claro como con el uso de todos los láseres disponibles en el equipo. Alternativamente con el fin de verificar la expresión de eGFP en frascos de cultivo T75 o T175, se utilizó un Microscopio de Fluorescencia Digital Leica DMI6000B mediante el uso del filtro de excitación BP 470/40 y el filtro de emisión BP 525/50 con una magnificación 10X,

gentilmente prestado por el Dr. Claudio Valverde y personal de su laboratorio.

Para los ensayos de caracterización del sistema de expresión no se recolectaron los sobrenadantes de las células transfectadas, sino que luego de las 48 horas de transfección se obtuvieron únicamente las fracciones celulares de las monocapas.

Para los ensayos de producción de VLPs, se colectaron los sobrenadantes de los cultivos durante los 5/7 días siguientes en tubos cónicos de 50 mL, en los cuales se esperó encontrar las VLPs generadas a partir de la expresión de Z, ya que la misma impulsa la brotación hacia el medio extracelular. Diariamente cada frasco de cultivo fue suplementado nuevamente con el mismo volumen de medio de cultivo DMEM 2% fresco. El último día de recolección de sobrenadantes (168/216 horas post-transfección), se recuperaron las monocapas celulares utilizando el *buffer* de lisis ProteoJET *Mammalian Cell Lysis Reagent* (Fermentas), a razón de 16 µL/cm^2 de la superficie del recipiente. Dichos lisados se denominaron "fracción celular" y fueron recolectados en tubos cónicos de 15 mL, que posteriormente fueron almacenados a -20°C rotulados adecuadamente hasta el momento de uso.

Purificación de VLPs

Los sobrenadantes de cultivos transfectados fueron almacenados a 4°C hasta el momento de su procesamiento. Inicialmente fueron clarificados mediante centrifugación de 10 minutos a 5000 revoluciones por minuto (rpm) en la centrífuga G-142D y el rotor G-650 (Gelec). Posteriormente, se realizó una ultracentrifugación en tubos de fondo redondo (*Ultra-Clear tubes*, Beckman), en colchón de sacarosa (30% m/v) estéril a 96000*xg* bajo 4°C y durante 1 hora, en condiciones de esterilidad. Los equipos utilizados fueron las ultracentrífugas Optima L-90K (Beckman) y Optima XE-100 (Beckman), pertenecientes a la Universidad Nacional de Quilmes. Como alternativas cuando las mismas se encontraban fuera de servicio se utilizaron la centrífuga Beckman Coulter LE-80K (IBBM-UNLP), gentilmente prestada por la Dra. María Laura García o la centrífuga Beckman L7-75 (Fundación Instituto Leloir), gentilmente prestada por el Dr. Juan Ignacio Ispizua. Los rotores utilizados siempre fueron de tipo *swinging bucket* y se seleccionaron de acuerdo con el volumen de las muestras a utilizar en cada oportunidad y la disponibilidad de los mismos en los centros de investigación. Los rotores utilizados fueron: SW28, SW32Ti, SW40Ti y SW41Ti. El sobrenadante fue descartado, y los *pellets* se resuspendieron en 400 µL de *buffer* PBS 1X estéril y posteriormente se almacenaron a 4°C.

Una fracción de las VLPs (el 5% del volumen total) fue reservada para control de las siguientes etapas, mientras que el resto fue tratado con 0,2 µL de proteinasa K (20 mg/mL), con el objeto de eliminar las proteínas que pudiesen haber sido co-purificadas y que no forman parte de la estructura de las VLPs, así como VLPs defectuosas. Como control de esta

reacción, se utilizó un tubo conteniendo *Bovin Serum Albumin* (BSA). Todos los tubos se incubaron durante 30 minutos a 37°C y luego se detuvo la reacción mediante el agregado de *Phenylmethylsulfonyl Fluoride* (PMSF) a una concentración final de 1 mM. Luego se verificaron los patrones de proteínas resultantes del tratamiento con la proteinasa, mediante una electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de 15 µL de cada uno de los tubos anteriores.

Por último, el volumen restante del tubo de VLPs purificadas y tratadas con proteinasa K fue ultracentrifugado en colchón de sacarosa bajo las mismas condiciones que han sido detalladas previamente. El sobrenadante se descartó y el *pellet* resultante se resuspendió en 100 µL de PBS 1X estéril. Las preparaciones de VLPs resultantes fueron almacenadas a 4°C hasta el momento de su uso.

Análisis y validación de las VLPs

Las VLPs obtenidas fueron cuantificadas mediante el método de Bradford como se detalla debajo. Con el fin de verificar la actividad correcta de la proteinasa K se realizó un SDS-PAGE (12% m/v) utilizando el sistema *Laemmli* bajo condiciones reductoras analizando las muestras de VLPs antes y después del tratamiento con la proteinasa K y utilizando BSA como control. Las partículas fueron utilizadas para análisis inmunológicos únicamente cuando todos y cada uno de los controles fueron correctos y exceptuando algunos casos siempre se utilizaron las fracciones tratadas con proteinasa K.

Cuantificación de VLPs

La cuantificación de VLPs se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), realizando por duplicado tanto la curva de calibración como la dilución de las muestras de VLPs a cuantificar. Brevemente, se prepararon tubos con concentraciones crecientes de la proteína BSA a partir del *stock* (0,1 mg/mL), con el objetivo de contar con una curva de calibración. Las concentraciones analizadas fueron 0, 5, 10, 20, 30 y 40 µg/mL. Luego se realizaron diluciones seriadas de las muestras de VLPs y se trasvasaron todas las soluciones a una placa de 96 pocillos. Finalmente se agregaron 40 µL del reactivo de Bradford 5X a todas las muestras incógnitas, así como a las de la curva de calibración y se incubaron aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente, teniendo en cuenta que la reacción es estable en el rango de 1 hora. A continuación, se midió absorbancia a 595 nm en el equipo *Cytation* 5 (Biotek) o el lector de microplacas UV visible (BioTek Epoch) y los datos resultantes fueron analizados mediante el uso de Microsoft Excel. Con la curva de calibración es posible obtener la ecuación correspondiente a la regresión lineal, pudiendo luego interpolar los valores de absorbancia a 595 nm de las muestras de VLPs, que se corresponden a una determinada concentración.

Biología molecular

Cultivos bacterianos

Los cultivos bacterianos se llevaron a cabo en medio LB líquido y en el caso de cultivos en placas de Petri se preparó LB sólido. Las mezclas anteriores fueron esterilizadas por autoclavado y posteriormente fueron agregados los antibióticos correspondientes para cada caso (ampicilina: *stock* 1000X, 100mg/mL; kanamicina: *stock* 1000X, 50mg/mL; tetraciclina *stock* 100X: 50 mg/mL; cloranfenicol: *stock* 1000X 34 mg/mL).

Stocks bacterianos

Con el fin de mantener a largo plazo la fuente de las construcciones plasmídicas verificadas, los cultivos bacterianos crecidos *overnight* idealmente en fase exponencial fueron mezclados con glicerol estéril a una concentración final de 25% v/v. Los *stocks* glicerinados fueron almacenados a -80°C con el fin de ser utilizados como inóculo para cultivos líquidos posteriores, necesarios para el proyecto.

Purificación de plásmidos

Todos los plásmidos y vectores de clonado fueron purificados mediante minipreparación por lisis alcalina (miniprep), seguida de precipitación con isopropanol (Sambrook et al., 1989). Brevemente, se utilizaron cultivos bacterianos de 5 o 10 mL, los cuales fueron centrifugados en microcentrífuga a velocidad máxima. Los *pellets* resultantes fueron resuspendidos en tres soluciones distintas, típicas de la técnica estándar de lisis alcalina. A continuación, se llevaron a cabo una serie de extracciones orgánicas en cloroformo y una posterior precipitación con isopropanol. Alternativamente la purificación de plásmidos se realizó mediante el uso del kit comercial Puro Plásmido (PB-L) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Finalmente, la integridad de los productos de dicho procedimiento fue verificada mediante electroforesis en geles de agarosa 0,8% m/v, teñidos con bromuro de etidio y visualizados mediante transiluminación con luz ultravioleta (UV). La cantidad y calidad del ADN resultante se analizó mediante espectrometría, utilizando el equipo NanoDrop 1000® (*Thermo FisherScientific*), considerando la absorbancia a 260 nm y las relaciones 260/230 nm y 260/280 nm.

Electroforesis de ácidos nucleicos

Con el fin de verificar la integridad y presencia de ácidos nucleicos manipulados en diversos procedimientos, se llevaron a cabo electroforesis en geles de agarosa 0,8% m/v con *buffer* TAE 1X. La fuente de alimentación utilizada fue el modelo PowerPac1000 (Biorad) y la cuba de electroforesis utilizada fue del tipo horizontal (Biorad). Las muestras fueron

sembradas en conjunto con el *buffer* de siembra naranja G 5X y dichos geles fueron teñidos con bromuro de etidio a una concentración final de 10 mg/mL (Sigma), reactivo que fue agregado durante la preparación de los geles. Los materiales contaminados con dicho agente químico fueron descartados cumpliendo con las normas de seguridad establecidas por el Departamento de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes y la Provincia de Buenos Aires. En general las corridas electroforéticas se llevaron a cabo por 40 minutos a 90 voltios.

La visualización de los geles fue a través de transiluminación con luz ultravioleta (UV) y la captura de imágenes mediante el uso del equipo Gel Doc EZ Gel Documentation System (BIORAD). Además, todas las corridas electroforéticas fueron acompañadas por la siembra de un patrón de peso molecular, siendo el *Ladder* 1 Kpb *Plus* o el *Ladder* 100 pb (PB-L) según correspondía en cada caso los cuales fueron utilizados con el fin de determinar el tamaño de los fragmentos lineales y en otros casos para cuantificar de forma relativa los ácidos nucleicos.

Producción de marcadores de peso molecular de ADN

En algunas oportunidades en lugar de utilizar marcadores de peso molecular comerciales, se utilizaron los plásmidos pPSU1 y pPSU2 digeridos con enzimas de restricción para obtener los *ladders* 100pb y 1kb, respectivamente. Se siguieron los procedimientos indicados por el grupo de investigadores que los reportó (Henrici et al., 2017).

Digestiones enzimáticas

Las digestiones se realizaron *overnight* a una temperatura de 37°C, utilizando las unidades enzimáticas indicadas por el proveedor (Thermofisher, PB-L, New England Biotechnology). Luego, dichas enzimas fueron inactivadas mediante el uso de un bloque térmico en caso que sea posible, siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis de los productos se llevó a cabo mediante electroforesis analíticas en geles de agarosa y mediante la comparación de las bandas obtenidas con el patrón de fragmentos del marcador molecular utilizado, generalmente siendo el *Ladder* 1 Kpb *Plus* (PB-L).

Preparación de bacterias competentes térmicas

Con la finalidad de transformar plásmidos a bacterias y ante la falta de un electroporador en nuestro laboratorio, se han preparado bacterias competentes térmicas. Inicialmente se realizó un estriado por agotamiento de bacterias XL1 *BLUE* a partir de un *stock* almacenado en 20% final de glicerina en una placa de agar de LB sin antibiótico. Luego de una incubación *overnight* (ON) a 37°C, este material fue empleado para inocular 25 mL de medio LB al que previamente se adicionó tetraciclina 10 ng/µL. Este cultivo fue incubado ON a 37 °C y 200 rpm de agitación orbital, y se empleó como inóculo de 3 medios de cultivo,

empleando 10, 4 y 2 mL respectivamente del cultivo anterior. Previo a esto, se agregaron 1,25 mL de $MgCl_2$ filtrado y 50 µL de tetraciclina a cada uno de los medios. Estos cultivos fueron incubados ON a 22°C y 200 rpm. Posteriormente se midió DO_{600} a cada uno de los cultivos hasta alcanzar valores comprendidos entre 0,4 y 0,9. Para ello se utilizó un espectrofotómetro Smartspec 3000 (Bio-Rad). A continuación, se centrifugaron las células a 2500*xg* durante 10 minutos a 4°C y las bacterias fueron resuspendidas en 80 mL de INOUE 10 mM frío y luego se centrifugaron nuevamente a 2500*xg* durante 10 minutos a 4°C. Finalmente el *pellet* fue resuspendido en 20 mL de INOUE frío y se adicionaron 1,5 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) a cada mezcla. Para concluir, la solución final se fraccionó cada 300 µL en microtubos estériles de 1,5 mL que inmediatamente fueron lanzados a un envase conteniendo nitrógeno líquido. Luego de recuperarse los tubos, se rotularon y se almacenaron a -80°C hasta su momento de uso.

Transformación térmica y siembra en placa

Tanto los plásmidos como los productos de ligación fueron transformados a las bacterias *Escherichia coli* competentes térmicas de diversas cepas, mediante protocolos de transformación térmica. En general se transformó la mitad del volumen final de la ligación o como máximo 1 ug. Brevemente el proceso de transformación térmica constó de una incubación inicial de 50 µL de bacterias competentes térmicas junto con la ligación en hielo durante 30 minutos y luego se colocaron a 42°C durante 90 segundos. A continuación, se mantuvieron de 2 a 5 minutos en hielo y finalmente se adicionaron 900 µL de medio LB sin antibiótico. Luego de 1 hora en agitación a 200 rpm y 37°C, se esparcieron las bacterias en placas de agar con el antibiótico adecuado al vector. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C y finalmente se analizó la presencia de colonias bacterianas.

Selección de bacterias recombinantes

→ **PCR de colonias**

Se tomó parte de las colonias a analizar mediante el uso de un palillo estéril y luego se colocó en microtubos estériles de 0,5 mL. Se adicionaron 10 µL de agua ultrapura y se incubaron a 100°C durante 10 minutos. A continuación, se centrifugaron a velocidad máxima durante 15 minutos en una microcentrífuga de mesada. Posteriormente 1 µL de cada uno de los sobrenadantes fueron utilizados como molde para llevar a cabo una reacción de amplificación de ADN. Para ello se utilizaron *primers* específicos, universales (**Tabla 4**) o combinaciones de los mismos.

Nombre	Secuencia	Temperatura de hibridación	Vectores
T7 prom	5’ TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3’	54°C	pET-28a (+)
T7 ter	5’ GCT AGT TAT TGC TCA GCG G 3’	60°C	
CMV prom	5’ CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG 3’	71°C	pZ
SV40 ter	5’ GTG GTT TGT CCA AAC TCA TC 3’	58°C	
pJET -Fw	5’ CGA CTC ACT ATA GGG AGA GCG GC 3’	67°C	pJET 1.2 BLUNT
pJET - Rv	5’ AAG AAC ATC GAT TTT CCA TGG CAG 3’	63°C	

Tabla 4. Listado de *primers* universales para la realización de PCR de colonias y reacciones de secuenciación. Se muestran los nombres asignados y las secuencias de cada uno en sentido 5’→ 3’. También se utilizaron *primers* específicos del inserto, cuyas secuencias se muestran en la **Tabla 9**.

El volumen final de reacción fue de 10 µL y las concentraciones finales de los reactivos utilizadas fueron: 1 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTPs, *primers* forward y reverse 1 µM cada uno y 1 unidad de la ADN polimerasa termoestable Pegasus (PB-L).

Desnaturalización inicial	**95°C**	**3 minutos**	**1 ciclo**
Desnaturalización	**94°C**	**30 segundos**	**40 ciclos**
Hibridación	**60°C**	**30 segundos**	
Extensión	**72°C**	**1 min 30 seg**	
Extensión final	**72°C**	**10 minutos**	**1 ciclo**
Cooling	**4°C**	**∞**	

Tabla 5. Perfil de ciclado “pJET” para las reacciones de PCR de colonias. Se muestran las temperaturas, tiempos de incubación y ciclos correspondientes a cada paso.

Desnaturalización inicial	**95°C**	**3 minutos**	**1 ciclo**
Desnaturalización	**94°C**	**30 segundos**	**40 ciclos**
Hibridación	**64°C**	**30 segundos**	
Extensión	**72°C**	**1 min 30 seg**	
Extensión final	**72°C**	**10 minutos**	**1 ciclo**
Cooling	**4°C**	**∞**	

Tabla 6. Perfil de ciclado “T7+esp” para las reacciones de PCR de colonias. Se muestran las temperaturas, tiempos de incubación y ciclos correspondientes a cada paso.

Desnaturalización inicial	**95°C**	**3 minutos**	**1 ciclo**
Desnaturalización	**94°C**	**30 segundos**	**40 ciclos**
Hibridación	**53°C**	**30 segundos**	
Extensión	**72°C**	**1 min 30 seg**	
Extensión final	**72°C**	**10 minutos**	**1 ciclo**

Cooling	**4°C**	**∞**	

Tabla 7. Perfil de ciclado "pET28" para las reacciones de PCR de colonias. Se muestran las temperaturas, tiempos de incubación y ciclos correspondientes a cada paso.

Desnaturalización inicial	**95°C**	**3 minutos**	**1 ciclo**
Desnaturalización	**94°C**	**30 segundos**	**40 ciclos**
Hibridación	**56°C**	**30 segundos**	
Extensión	**72°C**	**1 min 30 seg**	
Extensión final	**72°C**	**10 minutos**	**1 ciclo**
Cooling	**4°C**	**∞**	

Tabla 8. Perfil de ciclado "pZ" para las reacciones de PCR de colonias. Se muestran las temperaturas, tiempos de incubación y ciclos correspondientes a cada paso.

Posteriormente, la mezcla de PCR fue sometida a una electroforesis analítica en gel de agarosa 0,8% m/v para verificar la presencia de los productos deseados. Las colonias que presentaron amplificación de un fragmento del tamaño deseado fueron analizadas luego mediante la realización de un mapa físico.

→ **Mapas físicos por digestión enzimática**

Se llevó a cabo una extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina de las colonias candidatas seguida por precipitación alcohólica y luego se incubó con diversas enzimas de restricción. Dichas enzimas fueron identificadas mediante un análisis *in silico* utilizando el software Clone Manager (Sci Ed). Las condiciones de reacción fueron establecidas a partir de las instrucciones brindadas por el fabricante de las enzimas de restricción. Finalmente, las mezclas de digestión fueron visualizadas en electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio y revelados por transiluminación UV. El patrón de bandas resultantes fue analizado en función de identificar los clones que portaban las secuencias deseadas.

Secuenciación de ácidos nucleicos

Las construcciones plasmídicas que demostraron portar los insertos de interés fueron posteriormente analizadas mediante secuenciación. Para ello, se purificó el ADN plasmídico, y se tercerizó el servicio de secuenciación automatizada a Macrogen (Korea) mediante el uso de *primers* universales del proveedor.

Los datos de las secuencias, así como sus respectivos cromatogramas fueron analizados para comprobar la correcta lectura de los productos y acotar las regiones de los resultados al intervalo de las secuencias que portaban buena calidad de lectura, es decir secuencias confiables. En función de ello, se establecieron las secuencias finales para cada uno de los plásmidos. Posteriormente se llevó a cabo la verificación de la identidad de las

secuencias obtenidas utilizando la herramienta BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Además, se llevó a cabo un alineamiento de las secuencias obtenidas con las predichas *in silico* utilizando el programa MEGA versión 7.0.21.

Electroforesis de proteínas

Los perfiles de expresión de proteínas fueron analizados mediante la realización de electroforesis en geles de poliacrilamida 12% m/v, porcentaje elegido en función del tamaño de las proteínas de interés. En la preparación del gel se incluyó el compuesto *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) y por lo tanto las muestras fueron sujetas a un SDS-PAGE utilizando el sistema *Laemmli* bajo condiciones reductoras (Sambrook, J., Maniatis, T., & Fritsch, 1989). El espesor de dichos geles fue de 0,75 mm utilizando el sistema de *buffer* Tris-Glicina y el equipo utilizado fue *Mini-PROTEAN Tetra Cell* (Biorad). Para cada calle se separaron 15 µL de muestra en un microtubo de 0.6 mL y se adicionaron 5 µL de *buffer* de siembra.

Posteriormente los microtubos se incubaron a 100°C durante 10 minutos y luego se centrifugaron durante 10 minutos a velocidad máxima (14000 rpm, 16,873*xg*) en una microcentrífuga de mesada (Centrifuge 5415-R, *Eppendorf*). Finalmente, el volumen total de las muestras fue sembrado y la electroforesis continuó hasta que la línea de corrida alcance el límite inferior del gel, siendo aproximadamente una duración de 40 minutos a 30 mA. El revelado de los geles se realizó mediante incubación con una solución de tinción a temperatura ambiente durante toda la noche. Para desteñir los geles se utilizó solución de destinción a temperatura ambiente en agitación hasta observar decoloración del gel. En todas las electroforesis se utilizaron marcadores de peso molecular *Blue Plus (*Trans*), el* marcador *Spectra BR (Thermofisher Scientific)* o en su defecto el marcador no preteñido *ProteinRuler® II* (Trans Biotech).

Western Blotting

Con el fin de corroborar la expresión de las proteínas correspondientes, se llevó a cabo la técnica de *Western Blotting* (WB) de las diversas muestras, utilizando anticuerpos específicos.

Una vez que se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), utilizando en esta oportunidad un marcador de peso molecular preteñido *Blue Plus* (Trans) o Spectra BR (Thermofisher), se procedió a llevar a cabo la transferencia hacia una membrana de PVDF (Amersham Hybond P 0.45, GE *Healthcare Life Sciences*) previamente activada en metanol absoluto (Anedra) durante 10 minutos. Para cada membrana se utilizaron 10 mL de metanol y 40 mL de *buffer* de transferencia sin metanol. El equipo utilizado fue el *Trans Blot SD Semi-dry Transfer Cell* (Biorad) y para ello se utilizó una corriente de 25 V durante 30

minutos. La membrana luego fue incubada *overnight* en agitación y a 4°C junto con la solución de bloqueo.

Al día siguiente se realizaron 3 lavados de la membrana con PBS 1X y luego la misma fue recortada en aquellos casos en los cuales la incubación de una misma membrana se correspondía con anticuerpos distintos. Con el fin de asegurar la correcta exposición con los anticuerpos, se generó una marca en el extremo superior izquierdo o derecho de la membrana (según corresponda en cada ocasión). Luego, se incubó la misma con los anticuerpos primarios, diluidos en la solución de dilución. La incubación se llevó a cabo durante 1 hora a 37 °C en agitación y a continuación se llevaron a cabo 3 lavados de 15 minutos cada uno, a temperatura ambiente y en agitación con una solución de PBS-TWEEN-20 0,1%. Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo secundario, diluido en la misma solución que el anticuerpo primario. Finalmente se llevaron a cabo 3 lavados finales con la solución de PBS-TWEEN-20 0,1% en agitación, a temperatura ambiente y durante 15 minutos cada uno.

Los anticuerpos primarios empleados en este trabajo fueron:

- **Antisuero (α) – Z:** IgGs purificadas a partir de un antisuero policlonal específico de Z, generado en conejos tras la inyección de la proteína a-Tio-Z-V5-His producida en bacterias y posteriormente purificada (Cherñac, 2006). Dicho antisuero fue proporcionado por la Dra. Cristina S. Borio, y el mismo fue generado en colaboración con el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad Nacional de Quilmes (Borio, 2013; Goñi et al., 2010).

- **α – eGFP:** suero policlonal que reconoce a la proteína eGFP, producido en conejos por el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad Nacional de Quilmes y cedido gentilmente por el Dr. Facundo C. Temprana.

- **α – HisTag:** anticuerpo monoclonal murino contra el *tag* de histidina gentilmente cedido por el Dr. Julián Maggio del Centro de Oncología Molecular y Traslacional de la Universidad Nacional de Quilmes.

Los anticuerpos secundarios utilizados tanto anti-conejo como anti-ratón fueron adquiridos a Santa Cruz Biotechnology, dependiendo del caso y todos se encontraban asociados a peroxidasa de rábano picante (HRP).

El revelado fue llevado a cabo utilizando: el reactivo Bio-lumina (Kalium Technologies), placas radiográficas (Medical X ray film, AGFA), un *HypercassetteTM* (GE-Amersham) y

soluciones de fijado y revelado (G334 y G150 respectivamente, AGFA). Los tiempos de revelado fueron variables, dependiendo de la intensidad de las bandas observadas en las placas a los distintos tiempos. Finalmente, la membrana fue teñida con el colorante Rojo Ponceau o una solución de AmidoBlack en isopropanol y a continuación se dejó secar. Por último, se compararon los patrones de expresión proteica en la membrana, con los resultados observados en las placas radiográficas.

MATERIALES Y MÉTODOS DEL CAPÍTULO III

Materia viva

- ➔ Ratones BALB/c, cuya apariencia es albina y su genotipo es *A/A Tyrp1^{b}/Tyrp^{b}Tyr^{c}/Tyr^{c}.*

- ➔ Ratones C57BL/6, cuya apariencia es negra y su genotipo es a/a. Esta cepa de ratones es la más utilizada de ratones endocriados y es homocigota para *Cdh23^{ahl}*, lo que resulta en una pérdida de la audición a partir de las 10 semanas de edad.

Cuidado de los animales de laboratorio

Los animales de las dos cepas mencionadas anteriormente fueron provistos por el bioterio del Instituto de Medicina Experimental de la Academia Nacional de Medicina. Dichos animales fueron endocriados bajo estrictas barreras sanitarias, las cuales son monitoreadas periódicamente en *Charles River Laboratory*, Wilmington MA, USA mediante técnicas de PCR (PRIA) que evalúan la presencia de más de 30 agentes biológicos.

Para los ensayos detallados debajo se utilizaron ratones machos BALB/c y C57BL/6 de 6-8 semanas de edad, criados en las instalaciones del IMEX-ANM en Buenos Aires. Los animales fueron mantenidos bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y a 22°C, alimentados con una dieta estándar y acceso de agua *ad libitum*. Además, se aseguró que los animales se encuentren libres de patógenos, siguiendo los protocolos establecidos en la “Guía de cuidado y uso de animales de laboratorio” (NIH, 2011).

Declaración ética

Todos los protocolos experimentales fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente estándares éticos internacionales para la experimentación animal (Protocolo de Amsterdam del bienestar y la protección animal y del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos). Además, todas las actividades que impliquen la manipulación de animales han sido aprobadas por el Comité de Ética Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Academia Nacional de Medicina (CICUAL Nº 039/2017).

Generación de VLPs

La construcción plasmídica pZ-eGFP requerida para la producción de VLPs (**Figura 13**) ha sido generada previamente por integrantes del laboratorio (Borio, 2013). Este plásmido al transfectarse a células eucariotas da lugar a la generación de VLPs que portan una fusión proteica Z-eGFP en la cara interna de las mismas. Las células utilizadas para ello fueron las HEK293T y los procedimientos seguidos para la transfección de las mismas, recolección de sobrenadantes y procesamiento de las muestras se encuentran detallados previamente. Con el fin de obtener una cantidad suficiente para llevar a cabo los ensayos correspondientes, para cada lote de $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ se utilizaron al menos 8 frascos T75 cm^2. Todos los pasos requeridos para la purificación de VLPs fueron realizados en condiciones asépticas y utilizando materiales y reactivos estériles en cuanto fue posible. Las VLPs fueron utilizadas para análisis inmunológicos únicamente cuando todos y cada uno de los controles fueron correctos y únicamente se utilizaron las fracciones tratadas con proteinasa K en todos los casos.

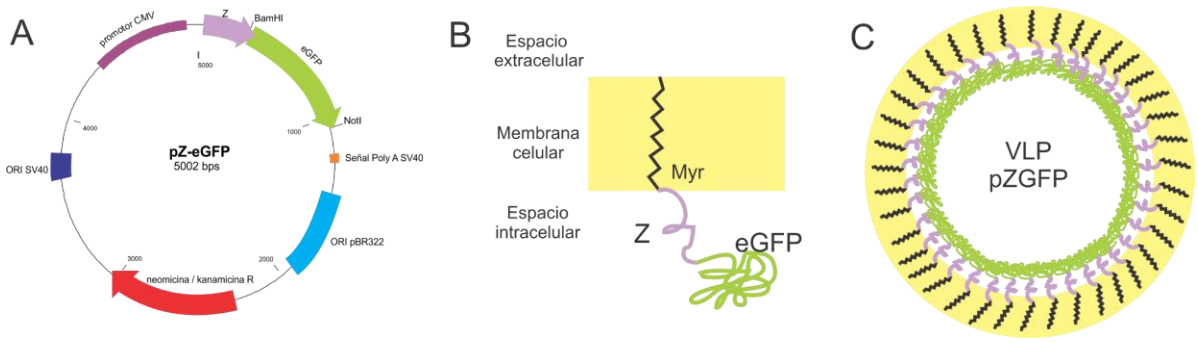


Figura 13. Plásmido pZ-eGFP y morfología en membrana celular. A. Mapa de la construcción pZ-eGFP. El plásmido posee resistencia a kanamicina, un origen de replicación procariota pBR322 y origen de replicación eucariota SV40. Además, la fusión proteica Z-eGFP se encuentra flanqueada por el promotor de Citomegalovirus (CMV) y el terminador SV40. **B. Ubicación relativa de los componentes del sistema.** La proteína Z se ancla a la cara interna de la membrana plasmática mediante un residuo miristoilo que se adiciona en su extremo amino terminal, permitiendo que la fusión proteica Z-eGFP se encuentre en el espacio intracelular. **C. Morfología de las $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$.** Como la construcción se encuentra en la cara interna de la membrana celular, las VLPs son envueltas y la fusión proteica se encuentra protegida dentro de la estructura de las vesículas.

Western Blotting

Los anticuerpos utilizados para las $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ fueron tanto el suero policlonal de conejo anti Z en una dilución 1:1000 como el suero policlonal de conejo anti GFP utilizando una dilución 1:2000. Las incubaciones para cada uno fueron de 1 hora a 37°C en agitación. El resto del procedimiento se realizó como se detalla anteriormente.

Densitometría de bandas

Con el fin de determinar la carga de eGFP en las VLPs, se utilizaron imágenes de *Western Blotting* utilizando el suero policlonal anti eGFP que contrastan las muestras con un estándar de proteína eGFP pura. Las imágenes fueron analizadas mediante el uso del software Image J (NIH) para determinar la relación entre la intensidad de las bandas en la misma placa radiográfica. Los datos obtenidos fueron graficados utilizando el software GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software).

Ensayo de LAL

Para precisar la presencia de endotoxina en las preparaciones de VLPs, 5 µg de las $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ y PBS estéril como control fueron sujetos a análisis utilizando el kit comercial *Limulus Amebocyte Lysate test* (LAL QCL-1000) (Lonza). Como estándar se utilizó lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* O111:B4 (Sigma) y se siguieron las instrucciones indicadas por el fabricante. Como resultado, se obtuvo una lectura de absorbancia que al utilizar el estándar puede determinar tanto la concentración de LPS en las muestras como de unidades de endotoxina por µg.

Obtención de células dendríticas derivadas de médula ósea

Los ratones fueron eutanasiados en cámara de CO_2 y se obtuvieron sus fémures y tibias bajo condiciones de esterilidad. La médula ósea de dichos huesos fue obtenida tras la inserción de una jeringa de 1 mL con una aguja G25 dentro de la cavidad ósea con medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 completo y la expulsión del mismo hacia el otro extremo, recolectando el líquido en tubos cónicos de 15 mL. La mezcla obtenida se homogeneizó y luego los glóbulos rojos fueron lisados mediante el agregado de 1 volumen de NH_4Cl 0,45M y posterior agitación suave durante 2 minutos.

A continuación, las células fueron centrifugadas a 1800 rpm (478*xg*) durante 10 minutos en una centrífuga refrigerada (Thermo IEC, modelo GP8R) y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el *pellet* con 2 mL de medio RPMI completo y se contaron las células en la cámara de Neubauer utilizando una solución de azul tripán 0,4% m/v.

Finalmente se distribuyeron las células en placas no tratadas (BIOFIL), en una concentración 1,5 $x10^6$ células/mL. Además, se agregó un 20% de *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF, del inglés factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos) para promover la diferenciación de las células hacia células dendríticas. Para ello se utilizó el medio condicionado de células J558 productoras de GM-CSF. Alternativamente se utilizaron las citoquinas recombinantes rmGM-CSF 50 ng/mL y rmIL-4 10 ng/mL (PreproTech Inc.). Se agregó medio de cultivo fresco cada dos días y luego de 7-10 días se recolectaron las células remanentes, considerando a las mismas células dendríticas diferenciadas inmaduras.

Ensayos de inmunocitoquímica

Un total de $2,5x10^5$ células dendríticas derivadas de médula ósea fueron cultivadas en cubreobjetos estériles de un diámetro de 12 mm tratados con polilisina (Sigma-Aldrich). Luego, las células fueron incubadas en presencia de 0.5 µg de $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ durante 0, 10, 30 o 60 minutos en hielo. Una vez concluido el tiempo de incubación las células fueron fijadas con Paraformaldehído (PFA) 4% m/v durante 30 minutos a temperatura ambiente, luego se lavaron dos veces con solución fisiológica y se permeabilizaron con PBS-TRITÓN X-100 0,1% v/v durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células fueron bloqueadas con BSA 5% m/v durante 30 minutos a temperatura ambiente y se incubaron toda la noche a 4°C con un suero de conejo policlonal anti eGFP (1:500) y un anticuerpo monoclonal producido en ratas contra *Lysosomal Associated Membrane Protein 1 (*LAMP-1) en una dilución 1:500 (BD Pharmingen). Luego, los vidrios fueron lavados tres veces con PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios diluídos 1:500 (anti-rata- PE y anti-conejo-Alexa 488 (Jackson ImmunoResearch)). Las células fueron posteriormente montadas utilizando VECTASHIELD® (VectorLaboratories) y los vidrios se dejaron secar toda la noche. Una vez secos, se analizaron mediante microscopía confocal, utilizando un microscopio FluoView 1000 Olympus Confocal equipado con los láseres de 457 nm, 488 nm, 515 nm, 543 nm y 635 nm. Se obtuvieron imágenes magnificadas 60X que posteriormente fueron procesadas utilizando el software ImageJ (NIH).

Inmunización de ratones y diseño experimental

Ratones machos BALB/c libres de patógenos (6 semanas de edad, 6 por grupo) recibieron una inmunización primaria por ruta intraperitoneal seguida por un refuerzo en un volumen final de 100 µL, 15 días luego de la inmunización primaria. El esquema de inmunización consistió en 5 µg de $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ o eGFP pura. En el control negativo, indicado como "*mock*", los animales recibieron inyecciones con 100 µL de PBS estéril. El día final de cada experimento, los ratones fueron pesados en una balanza digital. Luego, los animales fueron sacrificados en el día 36 post-inmunización y se obtuvieron tanto la sangre total como los bazos, los ganglios linfáticos mesentéricos e inguinales (**Figura 14**). Los órganos linfoides secundarios de los ratones de grupos "*mock*" e inmunizados fueron homogeneizados y resuspendidos en medio RPMI completo.

Las muestras de sangre fueron sujetas a análisis hematológicos para determinar el estado fisiológico de los ratones y para ello se utilizó un equipo Abacus Junior Vet 5 (Diatron).

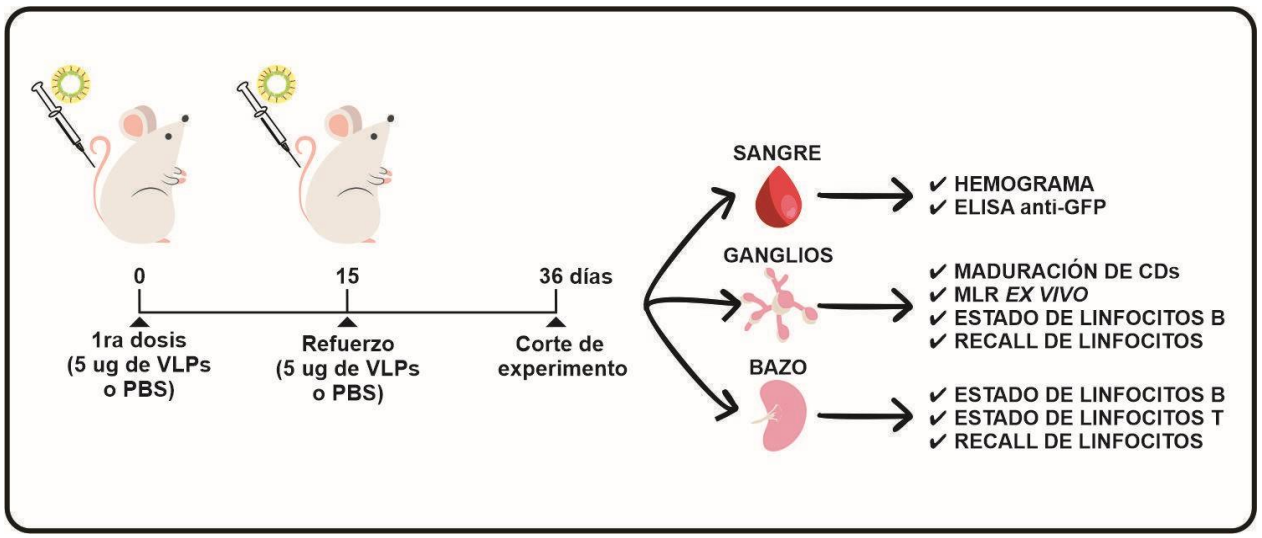


Figura 14. Esquema de inmunización y resumen de experimentos *in vivo* y *ex vivo* realizados. A la izquierda se muestra el esquema de inmunización utilizado. El día de corte de experimento se obtuvo la sangre total de cada ratón, además de sus ganglios mesentéricos e inguinales y sus bazos. A partir de la sangre se realizó un hemograma y a partir del suero derivado se realizó una determinación de anticuerpos anti eGFP mediante *Enzyme-linked immunosorbent Assay* (ELISA). Por otro lado, los ganglios fueron utilizados para analizar el estado madurativo de las células dendríticas (CDs), su funcionalidad, el estado de los linfocitos B y un *recall* de linfocitos T. Por último, los bazos fueron utilizados para analizar los estados de los linfocitos B y T y un *recall* de linfocitos T.

El experimento se realizó en 3 oportunidades en forma independiente, sumando en total 6 ratones control (PBS), 2 ratones inmunizados con eGFP pura y 10 ratones inmunizados con las VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$.

Caracterización *ex-vivo* de linfocitos

Finalizado el protocolo de inmunización, se obtuvieron asépticamente los bazos y ganglios linfáticos (mesentéricos, inguinales y placas de Peyer) de los ratones. A partir de dichos órganos se generaron suspensiones celulares mediante disgregación mecánica utilizando *mesh* y tijeras curvas. Las células fueron contadas y utilizadas para diversos ensayos.

Una parte de las mismas fueron marcadas con *carboxyfluorescein succinimidyl ester* (CFSE, Thermo Fisher) con la finalidad de determinar su proliferación. Para ello, un máximo de 10^7 células fueron marcadas en un volumen final de 1 mL utilizando CFSE a una concentración final de 7.5 nM. Se incubó durante 30 minutos a 37°C en oscuridad y se realizaron 3 lavados con RPMI-SFB 10%. Las células se mantuvieron por una última vez con RPMI-SFB 10% durante 30 minutos a 37°C y se centrifugaron durante 10 minutos a 1800 rpm. Los *pellets* celulares fueron resuspendidos en RPMI completo y utilizados para ensayos posteriores.

Dichos linfocitos fueron co-cultivados con CDs diferenciadas a partir de médula ósea de ratones *naïve* (relación 1:10), previamente estimuladas con 0.2 µg de distintos estímulos como VLPs $_{Z\text{-}eGFP}$, eGFP pura o PBS como control negativo. Luego de 5 días en placas de 96 pocillos de fondo redondo, las células fueron recolectadas y marcadas con los anticuerpos correspondientes. Los resultados se analizaron por citometría de flujo y los eventos fueron acotados a la región de la población de linfocitos. Se evaluó la emisión de fluorescencia de CFSE (FL-1), CD8-PE (FL-2) y CD4-Cy (FL-3) en 10.000 eventos acumulados.

Además, para determinar los cambios fenotípicos en las células dendríticas murinas o linfocitos murinos, las suspensiones celulares obtenidas a partir de los bazos o ganglios fueron posteriormente marcadas con anticuerpos acoplados a distintos fluorocromos como *Fluorescein IsoTioCyanate* (FITC), *Phycoerythrin* (PE) o PerCP-Cy5.5. Los epítopes de los anticuerpos utilizados fueron: CD11c, MHC clase II (IAd), CD86, B220, CD19, CD62L, CD69, CD4, CD8, o controles de isotipo (BD, eBioscience). El protocolo de tinción con anticuerpos se detalla debajo.

Separación de células mononucleares

Con el fin de purificar los linfocitos de las suspensiones celulares, se procedió a realizar una purificación por centrifugación en gradiente de Ficoll. Para ello se lisaron los glóbulos rojos utilizando *buffer* de lisis para glóbulos rojos durante 2 minutos y luego se diluyó con PBS 1X estéril y se centrifugó durante 10 minutos a 1400 rpm. El *pellet* de células resultante se resuspendió en 5 mL de PBS 1X y se sembraron suavemente sobre un colchón de Ficoll PM400 (GE healthcare) de una densidad de 1,077 g/mL. Posteriormente se centrifugó durante 30 minutos a 700*xg* sin freno en un tubo cónico de 15 mL y se recuperó la fracción de células mononucleares en la interfase observada. Las células fueron finalmente lavadas con PBS 1X, resuspendidas en RPMI completo y contadas para ser utilizadas en ensayos posteriores.

Marcación con anticuerpos y citometría de Flujo

Las suspensiones celulares fueron contadas y se separaron aproximadamente 10^6 células en cada tubo cónico de 15 mL para proceder a la tinción con anticuerpos acoplados con fluoróforos. A continuación, las células fueron lavadas con PBS 1X e incubadas con los anticuerpos correspondientes, considerando aproximadamente 0,2 µL de cada uno por cada millón de células. La tinción se llevó a cabo por 30 minutos a 4°C en oscuridad y se consideraron los controles correspondientes como muestras sin marca y simples marcas. En caso de utilizar más de un anticuerpo para una misma muestra, la incubación se realizó simultáneamente. Luego de la incubación las células fueron lavadas, fijadas con PFA 0,5% y el porcentaje de los eventos positivos fue determinado tras la recolección de 10.000 o 50.000 eventos por muestra (células dendríticas o linfocitos, respectivamente), limitando la región analizada en la población que se corresponde con los perfiles de tamaño y granularidad. Para ello, se utilizó el software

CELLQUEST en un Citómetro FACSCalibur (BD Immunocytometry Systems) o un Partec CyFlow Space con Cell Sorter (Sysmex).

Para la marcación intracitoplasmática de IFN-γ, se inhibió el transporte de proteínas utilizando Brefeldina A 10 µg/mL (Sigma-Aldrich). Luego de 6 horas de incubación con $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ o PBS, las células fueron lavadas y marcadas con un anticuerpo CD4-FITC o CD8-FITC anti ratón. Luego, las células fueron lavadas, fijadas, permeabilizadas y marcadas con anticuerpo anti IFN-γ acoplado a PE (e-Bioscience). Posteriormente se lavó nuevamente y se obtuvieron los resultados mediante citometría de flujo. Los datos resultantes fueron analizados mediante el uso del software FlowJo v10.8.1.

Cuantificación de la producción de IFN-γ

Para evaluar la respuesta inmunológica celular, se obtuvieron linfocitos derivados de bazos de los distintos grupos de ratones inyectados (4×10^6) y se cultivaron en medio RPMI completo, estimulando con 0.2 µg de $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ o sin estímulo. Las células fueron incubadas durante 72 horas a 37°C en una atmósfera con 5% de CO_2. Luego las células fueron centrifugadas y los sobrenadantes de cultivo fueron preservados a -80°C hasta realizar las determinaciones correspondientes. Para cuantificar las concentraciones de IFN-γ en los sobrenadantes de cultivo se utilizó un kit ELISA comercial específico para IFN-γ de ratones, siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Tras el uso de los estándares incluidos en el kit pudo determinarse la concentración de IFN-γ en los sobrenadantes de cultivos considerando una concentración final de pg/mL.

Estado madurativo *in vivo* de CDs

Seis ratones BALB/c fueron inyectados por vía intraperitoneal con 5 µg de $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ o con PBS. Veinticinco horas más tarde los ratones fueron sacrificados, se obtuvieron los ganglios linfáticos y se procesaron como se describió anteriormente. Las muestras fueron incubadas con anticuerpos monoclonales acoplados a fluoróforos direccionados contra las moléculas de superficie MHC clase II y CD86, cuya expresión fue analizada mediante citometría de flujo en la población de células $CD11c^+$.

Con la finalidad de llevar a cabo ensayos de *Mixed Lymphocyte Reaction* (MLR), se utilizaron esplenocitos de ratones C57BL/6 *naïve* que fueron separados del resto de la población celular mediante el uso de Ficoll PM400 (GE healthcare) siguiendo el procedimiento que se detalló anteriormente. Dichas células fueron marcadas con CFSE y utilizadas como células respondedoras mientras que los esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ o inyectados con PBS fueron utilizados como células estimuladoras en una relación 1:10. Luego de 5 días, se determinó la proliferación celular mediante citometría de flujo considerando la población

que demostraba una señal de fluorescencia baja para el canal FL-1 correspondiente a la emisión de CFSE.

Evaluación de las respuestas humorales

Al finalizar cada protocolo de inmunización se almacenaron los sueros de los ratones a -20°C. Con el fin de determinar la presencia y cantidad de anticuerpos contra eGFP inducidos por la inyección de las $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$, se revistieron placas de 96 pocillos para ELISA (Greiner) con 0.5 µg de la proteína GFP diluida en *buffer de coating*, permitiendo que este paso ocurra durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Luego, las placas fueron lavadas 4 veces con solución de lavado y bloqueadas con la solución de bloqueo a 37°C durante 1 hora en cámara húmeda. Posteriormente, las placas fueron lavadas nuevamente tres veces con solución de lavado y a continuación se añadieron 50 µL de cada muestra de suero, diluidas 1:50 en *buffer* de dilución. Las muestras se incubaron 2 horas a 37°C y luego se lavó 3 veces con solución de lavado. La detección de los anticuerpos unidos se determinó mediante el uso de un anticuerpo anti-ratón IgG conjugado con peroxidasa de rábano picante 1:2000 (BIORAD), diluido en *buffer* de dilución. La incubación se llevó a cabo por 1 hora a 37°C y luego de 3 lavados, se procedió a revelar cada pocillo con 50 µL de Tetrametilbencidina (TMB, Abcam). La reacción se frenó luego de 30 minutos mediante el agregado de solución de frenado para TMB (Abcam) y posteriormente se realizó la determinación de la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas UV visible (BioTek Epoch). Se realizó un duplicado para cada muestra, así como controles técnicos de pocillos que no poseen muestra, pero sí anticuerpo secundario y otros que no poseen muestra ni anticuerpos secundarios.

Análisis estadísticos

Todos los datos obtenidos fueron analizados en primera instancia utilizando el software InfoStat (Universidad Nacional de Córdoba) y posteriormente con el software GraphPad Prism 8.0.2 (Graphpad). Se verificó la normalidad de cada conjunto de datos, así como la homogeneidad de varianzas. En función de lo obtenido se realizaron análisis paramétricos o no paramétricos utilizando la prueba correspondiente. La significancia estadística fue determinada mediante análisis ANOVA seguidos por el *test* de comparación múltiple *post hoc* de Tukey o *tests* de t no pareados, según corresponda. Además, algunos experimentos fueron analizados mediante ANOVA de dos vías seguidas por la comparación múltiple de Tukey, de acuerdo al diseño experimental. Los datos se expresan como la media ± el desvío estándar. Para considerar significativo estadísticamente el p-valor debió ser menor que 0,05 y de acuerdo con la significancia se utilizó el siguiente código: *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$ y n.s.= no significativo.

MATERIALES Y MÉTODOS DE LOS CAPÍTULOS IV Y V

Generación de las herramientas de vehiculización y expresión

Diseño *in silico* de la estrategia de clonado

El objetivo del clonado molecular fue obtener las secuencias correspondientes a los marcos abiertos de lectura de cuatro variantes de superantígenos virales de MMTV: BALB2, BALB14, LA y mtv-7. La estrategia de clonado tuvo la finalidad de lograr las construcciones pZ-SAgs, utilizando el vector pZ y portando las secuencias de los cuatro superantígenos cada uno por su lado, con la intención de vehiculizarlos en VLPs utilizando sistemas de expresión de células de mamífero.

Por otro lado, la generación de construcciones pET-28a-SAgs, utilizando el vector pET-28a (+) para su expresión como proteínas individuales en sistemas de expresión de bacterias. El vector pET28-a fue seleccionado para ser el plásmido de expresión por dos razones principales: no hizo falta hacer una modificación en el diseño del clonado molecular para que sea compatible con el clonado en pZ y además facilita la purificación de las proteínas recombinantes mediante su expresión unida a un *tag* de histidina en la región amino terminal.

Para diseñar las construcciones plasmídicas se utilizaron secuencias de la plataforma GenBank (NIH) considerando los siguientes números de acceso: U71271 (BALB2), U71270 (BALB14) y U71272 (LA). Algunas de dichas secuencias son parciales y han sido publicadas gracias al trabajo previo de integrantes del Laboratorio de Inmunología Experimental del IMEX, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires (Golovkina et al., 1997). Para diseñar el clonado de la secuencia mtv-7 se utilizó un trabajo que reportaba la misma pero dicha secuencia no ha sido subida a bases de datos disponibles en línea (Brandt-Carlson et al., 1993). Además, dicha secuencia se utilizó en conjunto con la de BALB14 para diseñar la estrategia de clonado del superantígeno recombinante LA. Un resumen de la estrategia de clonado se puede observar en la **Sección III, Capítulo IV, Figura 31.**

Diseño de *primers*

Se diseñaron *primers* para obtener los cuatro insertos deseados agregando en su extremo 5' secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción: BamHI en el sentido y NotI en el antisentido, además de algunas pares de bases adicionales para asegurar el reconocimiento del sitio y digestión. Entre las secuencias de la proteína Z y el marco abierto de lectura de cada una de las variantes de los superantígenos se agregó una secuencia de unión única que ha sido previamente optimizada para permitir el correcto plegamiento de ambos integrantes de la proteína de fusión (Borio, 2013). Además, se tuvieron en cuenta los

requerimientos que rigen para el diseño de *primers*: composición de GC entre 50% y 60%; evitar la formación de estructuras secundarias en el mismo *primer* y entre pares (dímeros), especialmente en el extremo 3´; adecuada temperatura de hibridación y con una diferencia no mayor de 5°C entre los dos *primers*; siempre que sea posible conservar una purina en el extremo 3´, entre otros.

El mismo conjunto de *primers* fue utilizado para realizar los clonados en los dos vectores de expresión. Para planificar el paso a paso del clonado molecular, así como definir estrategias de selección de colonias recombinantes, se utilizó el programa Clone Manager 7 versión 7.11 (Sci Ed). Se determinaron las condiciones de amplificación óptimas, así como el perfil de ciclado. La síntesis de los *primers* diseñados fue tercerizada (Biodynamics) y la secuencia de cada uno se muestra en la **Tabla 9**.

Nombre	Secuencia
BALB2 Fw	5’ CGG GAT CC**A TCG CCA CC**A TGA GCC CAT CAG ACA AAG 3’
BALB2 Rv	5’ ATA AGA ATG CGG CCG CTT AAT AAC TCA AGG GCA ATG 3’
BALB14 Fw	5’ CGG GAT CC**A TCG CCA CC**A TGA GCC CAT CAG ACA AAG 3’
BALB14 Rv	5’ ATA AGA ATG CGG CCG CGG AAC CGC AAG GTT GGC C 3’
Mtv7 Fw	5’ CGG GAT CC**A TCG CCA CC**A TGC CGC GCC TGC AGC AGA AAT G 3’
Mtv7 Rv	5’ ATA AG AAT GCG GCC GCT TAA AAG GGA TCG AAG CCA AC 3’

Tabla 9. Listado de *primers* diseñados para obtener los insertos requeridos para este proyecto. Se muestran los nombres asignados y las secuencias de cada uno en sentido 5’→ 3’. Las secuencias subrayadas se corresponden con los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción BamHI y NotI. Las secuencias en negrita se corresponden con la secuencia de unión única entre Z y los marcos abiertos de lectura de los genes de interés.

Clonado Molecular

Materia viva

Para llevar a cabo las etapas de clonado molecular se utilizó la cepa bacteriana *E. coli* XL1 *BLUE*, genotipo *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F´ *proAB laclq ZΔM15* Tn10 (Tet^r)]. Esta cepa posee resistencia a tetraciclina y es deficiente para *RecA*, lo que mejora la estabilidad del inserto. Además, es capaz de tolerar mejor el clonado de proteínas tóxicas que otras cepas de *E. coli*, siempre y cuando no se adicione isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) al medio y esa es la razón de elección de esta cepa para los objetivos particulares del proyecto. Con ese fin, la cepa fue sometida a un protocolo de generación de competencia térmica (Sambrook et al., 1989).

Vector de clonado

✓ pJET 1.2 BLUNT (CloneJET *PCR Cloning Kit, Thermo Fisher Scientific*). Este vector posee un gen letal para las bacterias, que es interrumpido ante la inserción de un fragmento de ADN dentro del sitio de clonado múltiple y por lo tanto sólo las bacterias recombinantes sobreviven. El mismo otorga resistencia al antibiótico ampicilina.

Vector de expresión eucariota

➔ pZ. Este vector ha sido desarrollado previamente en el Laboratorio de Virus Emergentes, dentro del marco de la tesis doctoral de la Dra. Cristina Borio. El mapa detallado del plásmido puede observarse en la **Figura 15**.

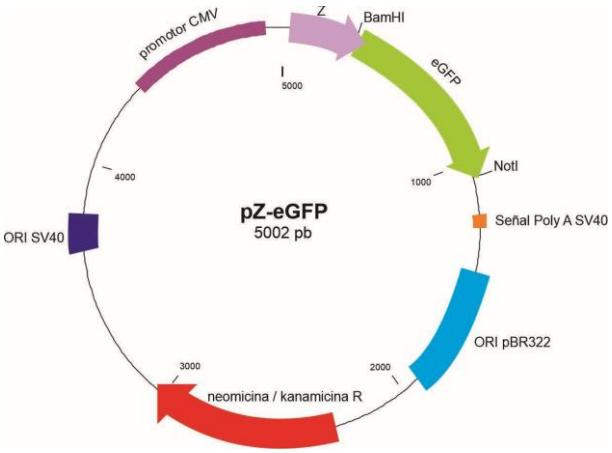


Figura 15. Esquema representativo de la construcción pZ-eGFP. El plásmido fue generado por el Dr. Agustín Ure de la Universidad Nacional de La Plata y gentilmente cedido a nuestro grupo de investigación. Para ello se utilizó el vector comercial pEGFP-N3 de Clontech al cual se le adicionó la secuencia de Z del virus Junín, Cepa Candid# en el sitio múltiple de clonado. Eso permite la expresión de la proteína de fusión Z-eGFP que tiene un peso molecular estimado de 37,9 kDa. La construcción otorga resistencia para neomicina/kanamicina, posee tanto un origen de replicación eucariota (SV40) como procariota (pBR322) y además cuenta con la maquinaria para la expresión de proteínas en sistemas eucariotas mediante el promotor CMV y la señal de poliadenilación SV40.

Vector de expresión procariota

➔ pET-28a (+). Este plásmido permite el clonado y la expresión de proteínas recombinantes en el sistema de *E. coli*. Los genes de interés se encuentran bajo el control de transcripción del bacteriófago T7. Este vector particular posee un sitio de fusión a un *tag* de histidinas en la región amino terminal que puede proteolizarse tras el uso de trombina y también una secuencia de *tag* de histidinas en la región carboxilo terminal. El mapa detallado del plásmido se muestra en la **Figura 16**.

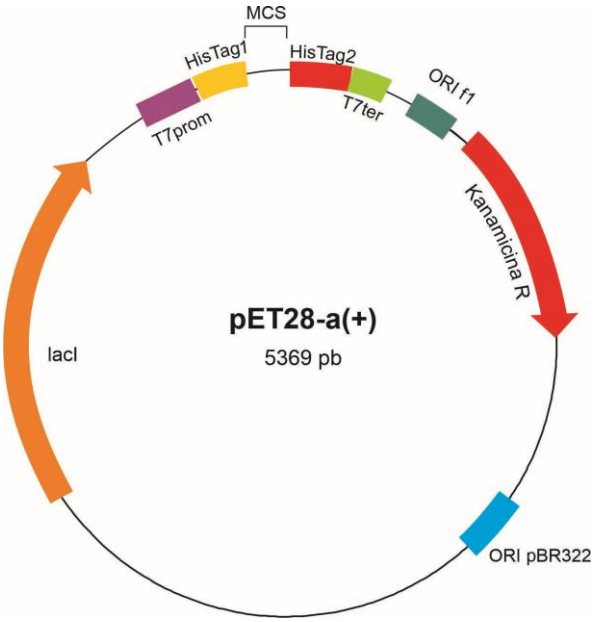


Figura 16. Esquema representativo de la construcción pET28-a (+). El plásmido es comercial y fue adquirido previamente por el laboratorio. La construcción otorga resistencia para kanamicina, posee un origen de replicación procariota (pBR322) y un origen de replicación del bacteriófago f1. Además, cuenta con la maquinaria para la expresión de proteínas en sistema procariota mediante el promotor T7, el terminador T7 y el inhibidor de lactosa para que la expresión sea inducida únicamente en presencia de IPTG. Asimismo, el plásmido posee dos secuencias repetitivas de histidinas que permiten la purificación mediante pseudoafinidad utilizando resinas de níquel. La secuencia HisTag1 se encuentra en el amino terminal de la proteína, mientras que la secuencia HisTag2 queda posicionada en el carboxilo terminal de la proteína. Dependiendo del diseño deseado se puede seleccionar alguna de las dos estrategias.

Obtención de los moldes de partida para la generación de los insertos

Para obtener los cuatro insertos se utilizaron distintas muestras de partida. En el caso de los superantígenos exógenos como BALB2, BALB14 y LA, se utilizaron glándulas mamarias de ratones BALB/cJ infectados por los distintos virus. En el caso de BALB2, se utilizaron las muestras de tumores de glándulas mamarias de ratones BALB/cJ cepa LA, muestras “LA 50 BIS” Y “LA 57 BIS”, generadas por una integrante previa del Laboratorio de Leucemia Experimental - IMEX-ANM (Dalia Burzyn). En el caso de BALB14 y LA se utilizó la muestra de tumores de glándulas mamarias de ratones BALB/cJ cepa LA muestra “LA 206 TUMOR 12/12/2006”, también trabajo previo de Dalia Burzyn.

Las muestras fueron descongeladas desde un tanque de Nitrógeno Líquido, pesadas y resuspendidas en TRIzol (ThermoFisher) para purificar el ARN total de las mismas siguiendo el protocolo que se detalla debajo. Luego de cuantificar el ARN de cada muestra mediante el uso de un NanoDrop 1000® (*Thermo Fisher Scientific*), se utilizaron aproximadamente 100 µg en una reacción de transcripción reversa con el fin de obtener el

ADN complementario total utilizando el kit FIREScript RT cDNA Synthesis (Solis Biodyne), siguiendo las instrucciones indicadas por el proveedor.

En el caso del superantígeno endógeno mtv-7, se requería utilizar muestra de genoma de alguna de las cepas de ratones endocriados que porten dicho SAg inserto, como los AKR. Dado que en el Bioterio del IMEX ya no se crían ratones AKR, se procedió a realizar un *screening* de todas las muestras disponibles en los freezers del laboratorio con posibilidades de portar la secuencia deseada. Además, la muestra debería ser de tejidos linfoides, ya que el resto de la secuencia del MMTV se halla modificada y el gen del SAg únicamente se expresa en ese tipo de tejidos (Ross et al., 1997). Es por ello que la muestra de partida utilizada fue el ADN complementario (ADNc) de un *pool* de placas de Peyer de retrocruzas de ratones entre cepas AKR y BALB/cJ que se encontraba rotulado como “LA1 12/09/2003”, trabajo previo de integrantes del Laboratorio de Leucemia Experimental del IMEX-ANM.

Purificación de ARN total

Las muestras descongeladas fueron pesadas en una balanza digital de bolsillo y en función de su peso fueron resuspendidas en TRIzol (Invitrogen) en una relación de 1 mL del mismo cada 100 mg de tejido. Luego, fueron disgregadas utilizando un homogeneizador de punta (OMNI TH), siempre manteniéndose en hielo. A continuación, se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos y posteriormente se agregaron 0.2 mL de cloroformo cada 1 mL de TRIzol. Se mezcló por inversión y luego se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron a 12000*xg* a 4°C durante 15 minutos y se recuperó la fase acuosa superior, la cual fue lavada con 0.5 mL de isopropanol por cada 1 mL de TRIZol. Luego de incubar por 10 minutos a temperatura ambiente se centrifugó a 12000*xg* por 10 minutos a 4°C y el *pellet* fue lavado con 1 mL de etanol 75%. Nuevamente se centrifugó a 7500*xg* durante 5 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante con pipeta. Finalmente, el *pellet* se dejó secar al aire por 10 minutos y luego se disolvió en 20 µL de agua libre de RNAsas, colocando en un bloque térmico a 65°C hasta que se observó total disolución del *pellet*. El ARN se almacenó por unas horas a -20°C y posteriormente se guardó a -80°C para su preservación a largo plazo.

Síntesis del ARN complementario

Se cuantificó el ARN total purificado de las distintas muestras mediante el uso de un NanoDrop 1000® (*Thermo Fisher Scientific*) y se evaluó tanto la absorbancia a 260nm como las relaciones A260/280 y A260/230. Luego se utilizaron aproximadamente 100 µg en una reacción de transcripción reversa con el fin de obtener el ADN complementario total utilizando el kit FIREScript RT cDNA Synthesis (Solis Biodyne), siguiendo las instrucciones indicadas por el proveedor. Para ello se colocaron aproximadamente 100 µg de ARN total junto con 1

µL de oligonucleótidos al azar 100 mM y llevando a volumen final 16 µL con agua libre de dnasas y rnasas. A continuación, los tubos se incubaron a 70°C durante 5 minutos en un termociclador Multigene y posteriormente se incubaron brevemente en hielo. Luego, se adicionaron: 1 µL de la enzima FIREScript RT (10 U), 2 µL del *buffer* de reacción con ditiotreitol (DTT) y 0,5 µL de dNTPs 20 mM. Finalmente se incubaron a 25°C durante 10 minutos, a 37°C por 1 hora, 85°C durante 5 minutos y a 4°C hasta almacenarlo a -20°C.

En todos los casos se priorizó el uso de oligonucleótidos al azar en lugar de utilizar oligonucleótidos dT. Antes de proceder con la obtención de los insertos, se verificó la integridad y calidad del ADN complementario realizando una *Polymerase Chain Reaction* (PCR, del inglés Reacción en cadena de la polimerasa) utilizando los oligonucleótidos de la proteína β-actina murina que se muestran en la **Tabla 10**.

Nombre	Secuencia	Temperatura de hibridación
Actina murina Fw	5' ATG GAT GAC GAT ATC GCT 3'	57°C
Actina murina Rv	5' ATG AGG TAG TCT GTC AGG T 3'	58°C

Tabla 10. Detalles de *primers* específicos para la amplificación de la secuencia de β-actina murina. Se muestran las secuencias y las temperaturas de hibridación correspondientes.

El perfil de ciclado utilizado para dichos *primers* se muestra en la **Tabla 11**.

Desnaturalización inicial	**94°C**	**3 minutos**	**1 ciclo**
Desnaturalización	**94°C**	**45 segundos**	**35 ciclos**
Hibridación	**55°C**	**30 segundos**	
Extensión	**72°C**	**1 minuto 30 segundos**	
Extensión final	**72°C**	**10 minutos**	**1 ciclo**
Cooling	**4°C**	**∞**	

Tabla 11. Perfil de ciclado para amplificar la secuencia de β-actina murina. Se muestran las temperaturas, tiempos de incubación y ciclos correspondientes a cada paso.

Obtención de los insertos mediante PCR punto final

Las reacciones de amplificación para obtener los insertos se realizaron bajo distintas condiciones que se detallan debajo:

- **mtv-7:** El volumen final fue de 25 µL y las concentraciones finales de los reactivos utilizadas fueron: 1 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTPs, *primers forward* y *reverse* 1 µM cada uno, DMSO 1% y 1,25 unidades de la ADN polimerasa termoestable Platinum™ Pfx (Thermofisher). Como molde se utilizaron 2 µL del ADN complementario rotulado como "LA1 12/09/2003", que se encontraba preservado a -20°C. En este caso se

realizó un ciclado desdoblado para mejorar la especificidad del producto obtenido y optimizar la cantidad del producto deseado. El perfil de ciclado utilizado se muestra en la **Tabla 12**.

Desnaturalización inicial	**94°C**	**3 minutos**	**1 ciclo**
Desnaturalización	**94°C**	**45 segundos**	**10 ciclos**
Hibridación	**58°C**	**30 segundos**	
Extensión	**68°C**	**1 minuto 30 segundos**	
Desnaturalización	**94°C**	**45 segundos**	
Hibridación	**66°C**	**30 segundos**	**25 ciclos**
Extensión	**68°C**	**1 minuto 30 segundos**	
Extensión final	**68°C**	**10 minutos**	**1 ciclo**
Cooling	**4°C**	**∞**	

Tabla 12. Perfil de ciclado para amplificar el marco abierto de lectura de mtv-7. Se muestran las temperaturas, tiempos de incubación y ciclos correspondientes a cada paso. El tamaño esperado del producto es de 1002 pb.

- **BALB2, BALB14 y LA**: El volumen final fue de 25 µL y las concentraciones finales de los reactivos fueron: 1 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTPs, *primers forward* y *reverse* 1 µM cada uno y 1 unidad de la ADN polimerasa PFU (PB-L). Como molde se utilizaron 2 µL del ADN complementario generado a partir del ARN total extraído de las distintas muestras. El perfil de ciclado para amplificar BALB2 se muestra en la **Tabla 13** y el perfil de ciclado para LA y BALB14, en la **Tabla 14**.

Desnaturalización inicial	**94°C**	**3 minutos**	**1 ciclo**
Desnaturalización	**94°C**	**45 segundos**	**40 ciclos**
Hibridación	**55°C**	**30 segundos**	
Extensión	**68°C**	**1 minuto**	
Extensión final	**68°C**	**10 minutos**	**1 ciclo**
Cooling	**4°C**	**∞**	

Tabla 13. Perfil de ciclado para amplificar el marco abierto de lectura de BALB2. Se muestran las temperaturas, tiempos de incubación y ciclos correspondientes a cada paso. El tamaño esperado del producto es de 870 pb.

Desnaturalización inicial	**94°C**	**3 minutos**	**1 ciclo**
Desnaturalización	**94°C**	**45 segundos**	**40 ciclos**
Hibridación	**58°C**	**30 segundos**	
Extensión	**68°C**	**1 minuto**	

Extensión final	**68°C**	**10 minutos**	**1 ciclo**
Cooling	**4°C**	**∞**	

Tabla 14. Perfil de ciclado para amplificar los marcos abiertos de lectura de LA y BALB14. Se muestran las temperaturas, tiempos de incubación y ciclos correspondientes a cada paso. Los tamaños esperados de los productos de amplificación son de 891 pb para LA y 912 pb para BALB14.

Los equipos empleados para llevar a cabo las reacciones de amplificación fueron el termociclador Ivema modelo T18, MJ Research PTC-200, *Mastercycler® Gradient* (Eppendorf) o Multigene TC96-CM-10 y además siempre que fue posible incluyó un control negativo para las reacciones en el cual se utilizó agua ultrapura (doblemente destilada y autoclavada) reemplazando al molde de ADN.

Obtención de los fragmentos para su clonado

Al finalizar las reacciones de PCR, la totalidad de los productos fueron sometidos a una electroforesis preparativa en gel de agarosa 0,8% m/v para verificar la presencia de los productos deseados. Los fragmentos correspondientes fueron escindidos del gel y el ADN fue purificado utilizando el kit PURO gel extraction (PB-L), siguiendo las instrucciones indicadas por el proveedor o alternativamente siguiendo un protocolo *in house* utilizando sílica-gel cuyo procedimiento se detalla debajo.

Al finalizar la purificación, se cuantificaron los ácidos nucleicos mediante el uso del equipo NanoDrop 1000® (*Thermo Fisher Scientific*) teniendo en cuenta la absorbancia a 260 nm así como las relaciones A260/230 y A260/280.

Purificación de ácidos nucleicos en tacos de agarosa utilizando sílica

Se colocaron 500 µL de *buffer* QG al tubo con el taco de agarosa y se incubó a 50°C hasta la disolución del mismo. Luego se mezcló la solución de sílica, se adicionaron 15 µL al tubo con el taco de agarosa y 10 µL de acetato de sodio 3M pH 5,2. Se incubó a 50°C durante 10 minutos y se homogeneizó cada 2 minutos. Se centrifugó 30 segundos a máxima velocidad y se descartó el sobrenadante. Luego, se lavó el *pellet* una vez con 500 µL de *buffer* QG y dos veces con 500 µL de *buffer* PE. Luego de dejar secar el *pellet* por 10/15 minutos a temperatura ambiente, se agregaron 20 µL de *buffer* EB y se incubó a 50°C durante 5/10 minutos. Finalmente se centrifugó 30 segundos a velocidad máxima y se recuperó el sobrenadante.

Ligación y transformación de bacterias

Los productos purificados fueron sometidos a reacciones de ligación utilizando la enzima ligasa de ADN del bacteriófago T4 (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las condiciones utilizadas fueron: en ausencia de Polietilenglicol (PEG) 4000, una

relación inserto/vector de 5:1 y una temperatura de 4°C *overnight.* Además, se utilizaron 50 ng del vector comercial pJET 1.2 BLUNT (Kit Clone Jet, Thermofisher) y para realizar los cálculos correspondientes se utilizó Biomath (Promega Tools). Posteriormente se procedió a transferir las construcciones ligadas a bacterias *E. coli* cepa XL1 BLUE competentes térmicas mediante los procedimientos detallados anteriormente. Dado que el vector posee la característica que únicamente permite la subsistencia de bacterias que tengan un inserto interrumpiendo un gen asesino, todas las bacterias recombinantes portaban algo en su sitio de clonado múltiple. Para verificar la especificidad de los insertos se llevaron a cabo procedimientos de PCR de colonias, mapa físico por digestión y finalmente secuenciación mediante método de Sanger, tercerizado a Macrogen.

Selección de bacterias recombinantes

Para seleccionar las colonias que portan las construcciones se llevaron a cabo las técnicas de PCR de colonias y mapas físicos por digestión enzimática, ambos descritos previamente. Las enzimas utilizadas para los clonados en pJET fueron: BglII (Thermofisher) y NotI-HF (NEB).

Posteriormente, las construcciones que obtuvieron resultados esperados mediante las dos técnicas de selección de recombinantes fueron analizadas mediante secuenciación por Sanger.

Transferencia de insertos a vectores de expresión

Una vez confirmada la presencia de las secuencias deseadas, insertas en las construcciones logradas, así como la identidad de las mismas, se procedió a transferirlas a los plásmidos de expresión. Para ello, se realizaron purificaciones de los plásmidos pJET-SAgs mediante miniprep por lisis alcalina seguida de precipitación con isopropanol (Sambrook et al., 1989). Posteriormente las construcciones fueron sometidas a digestiones enzimáticas dobles con las enzimas BamHI y NotI (Promega), que habían sido consideradas en el diseño de los oligonucleótidos en presencia del *buffer* H (Promega). También se realizó la digestión enzimática doble con las mismas enzimas de restricción utilizando como objetivo los vectores de expresión receptores de los insertos: pZ-eGFP y pET-28a (+). Las digestiones se realizaron durante toda la noche a 37°C.

Las construcciones digeridas fueron sometidas a electroforesis preparativas en geles de agarosa 0,8% m/v con el fin de escindir los fragmentos necesarios para las ligaciones posteriores. Los geles de agarosa fueron sometidos brevemente a luz UV para evitar mutaciones en las secuencias de ADN y luego los tacos de agarosa escindidos fueron sometidos a un protocolo de purificación de ADN mediante el uso de sílica, detallado anteriormente. Luego, se procedió a llevar a cabo las reacciones de ligación utilizando una

relación inserto:vector de 5:1 y las condiciones especificadas previamente. Se transformaron bacterias *E.coli* XL1 *blue* competentes térmicas y se sembraron en LB con agar portando el antibiótico kanamicina. Para verificar la especificidad de los insertos se llevaron a cabo procedimientos de PCR de colonias, mapa físico por digestión y finalmente secuenciación mediante método de Sanger tercerizado a Macrogen.

Para los clonados realizados en el vector pET-28a(+) se utilizaron las enzimas NcoI (Promega) y HincII (Promega). Para los clonados en el vector pZ se utilizó la enzima PstI (Thermofisher). Una vez verificada la secuencia e identidad de las construcciones plasmídicas logradas, se procedió a preservar *stocks* bacterianos portando los plásmidos deseados y posteriormente a expresar las construcciones en sistemas heterólogos.

Análisis bioinformático

Una vez obtenidas las secuencias se analizaron los intervalos de confianza de los cromatogramas y en función de eso se hizo una limpieza de las secuencias. A continuación, se realizaron alineamientos de las secuencias generadas con los *primers forward* y *reverse* para cada clon, generando la secuencia definitiva para cada uno. Dichas secuencias fueron comparadas con las de referencia en función de trabajos previos o de su disponibilidad en bases de datos mediante alineamientos utilizando el software MEGA. Posteriormente se evaluó la identidad de las mismas tras una búsqueda en la base de datos de BLAST.

Al seleccionar un clon para cada construcción se llevaron a cabo alineamientos de los nucleótidos correspondientes a las cuatro variantes de los SAgs de MMTV utilizando también el software MEGA. A partir de dicho alineamiento se generó un gráfico del tipo *Sequence Logo* (https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi) con el fin de evidenciar las regiones más conservadas y las más variables de las secuencias de los superantígenos clonados.

Además, a partir de las secuencias nucleotídicas se llevaron a cabo análisis bioinformáticos con respecto a las proteínas que se expresarán en cada sistema. Inicialmente se utilizó la herramienta “Translate” de Expasy Tools para transformar las secuencias nucleotídicas en aminoacídicas (https://web.expasy.org/translate/). Posteriormente se determinaron los parámetros de las proteínas de fusión resultantes utilizando la herramienta “ProtParam”, que predice los pesos moleculares y el punto isoeléctrico, entre otros parámetros (https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam). También se analizó la presencia de dominios transmembrana utilizando la herramienta HMMTOP, desarrollada por G.E Tusnády y I. Simon (http://www.enzim.hu/hmmtop/server/hmmtop.cgi). Por último, para las construcciones a ser empleadas en sistemas de producción de bacterias se utilizó la herramienta NetSolP-1.0 con la finalidad de determinar la solubilidad de las mismas (https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetSolP-1.0).

Caracterización del repertorio de linfocitos T

Purificación de ARN celular total

Como se indicó previamente, sumado a los análisis realizados mediante citometría de flujo, para cada día y cada tratamiento se almacenaron *pellets* de las células tratadas a -80°C para realizar análisis transcripcionales. Para ello se obtuvo el ARN de dichas células utilizando el kit Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Geneaid), siguiendo las instrucciones brindadas por el fabricante. Brevemente, cada *pellet* de células se resuspendió en 200 µL de solución fisiológica estéril y se agregó a un tubo en el que previamente habían 400 µL de *buffer* de lisis VB. Se homogeneizó y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, y luego se adicionaron 450 µL de *buffer* AD. Luego de mezclar bien, la totalidad del volumen se transfirió a las columnas incluidas en el kit. Se centrifugó durante 1 minuto a 13200 rpm en una centrífuga de mesada (Eppendorf) y se descartó el líquido remanente en el tubo colector. Posteriormente se lavó la columna dos veces: primero con 400 µL de *Buffer* W1 y luego con 600 µL de *Wash Buffer*. Se secó la resina de la columna tras centrifugación de 3 minutos a 13200 rpm y la columna se colocó en un microtubo nuevo. Luego, se agregaron 50 µL de agua en el centro de la columna, incubando 3 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se eluyó centrifugando durante 1 minuto a temperatura ambiente y el ARN se almacenó a corto plazo a -20°C.

Obtención del ADN complementario celular

Una vez obtenido el ARN total, se llevó a cabo una reacción de transcripción reversa para obtener el ADN complementario utilizando el kit de M-MLV (PB-L). Se tomaron 11 µL del ARN obtenido de cada *pellet* celular y se colocaron en un microtubo para PCR junto con 2 µL de *primers* al azar 10 µM y 2 µL de dNTPs. Luego de incubarlos a 70°C durante 5 minutos y 2 minutos de hielo, se procedió a agregar 4 µL del *buffer* de primera cadena (PB-L) y 1 µL de la enzima M-MLV. Se incubó durante 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 42°C y 5 minutos a 95°C. Para ello se utilizó un termociclador Ivema T21. Finalmente, los tubos se colocaron en hielo y se almacenaron a -20°C hasta ser utilizados.

Integridad del ADN complementario

Antes de avanzar con los ensayos de interés se aseguró la integridad del ADN complementario realizando una reacción de amplificación del gen de la β-actina humana utilizando el ADN complementario como molde en una reacción de PCR. Las concentraciones de los reactivos utilizados son las mismas que se indicaron previamente para el caso de la amplificación por PCR del gen de la β-actina murina. Las secuencias y temperaturas de hibridación de los *primers* utilizados se muestran en la **Tabla 15**.

Nombre	Secuencia	Temperatura de hibridación
Actina humana Fw	5’ TAT GTG GGT GAC GAG GCC CAG AG 3’	69°C
Actina humana Rv	5’ TAC TCC TGC TTG CTG ATC CAC ATC 3’	66°C

Tabla 15. Detalles de *primers* específicos para la amplificación de la secuencia de β-actina humana. Se muestran las secuencias y las temperaturas de hibridación correspondientes.

El perfil de ciclado utilizado para dichos *primers* se muestra en la **Tabla 16**.

Desnaturalización inicial	**94°C**	**3 minutos**	**1 ciclo**
Desnaturalización	**94°C**	**45 segundos**	**40 ciclos**
Hibridación	**56°C**	**30 segundos**	
Extensión	**72°C**	**1 minuto**	
Extensión final	**72°C**	**10 minutos**	**1 ciclo**
Cooling	**4°C**	**∞**	

Tabla 16. Perfil de ciclado para amplificar la secuencia de β-actina humana. Se muestran las temperaturas, tiempos de incubación y ciclos correspondientes a cada paso. El tamaño esperado del producto de amplificación es de 929 pb.

Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa 0,8% siguiendo las indicaciones detalladas anteriormente. En caso de observar las bandas de amplificación en el tamaño esperado, se avanzó en el uso de las muestras de ADN complementario como molde para otras reacciones de amplificación.

Caracterización molecular de la actividad biológica

Con la finalidad de caracterizar los procesos ocurriendo tras incubar a las diversas células con los distintos tratamientos, se evaluó la presencia de los ARN específicos para genes de relevancia como Fas y Fas ligando. Las secuencias de los *primers* utilizados se muestran en la **Tabla 17**. El perfil de ciclado utilizado fue idéntico al utilizado para β-actina humana (**Tabla 16**).

Nombre	Secuencia	Temperatura de hibridación
Fas humana Fw	5’ ACT GTA TGT GAA CAC TGT GAC CCT 3’	65°C
Fas humana Rv	5’ CAC TGT TTC AGG ATT AAG GTT GG 3’	61°C
Fas ligando Fw	5’ GGA TTG GGC CTG GGG ATG TTT CA 3’	69°C
Fas ligando Rv	5’ TTG TGG CTC AGG GGC AGG TTG TTG 3’	71°C

Tabla 17. Detalle de *primers* específicos para la amplificación de secuencias varias. Se muestran las secuencias y las temperaturas de hibridación correspondientes.

Caracterización de cadenas Vβ del receptor de linfocitos T

El ADN complementario también se utilizó para determinar las variantes de las cadenas del receptor de linfocitos T y así poder determinar la especificidad de los tratamientos. Para ello, se realizaron reacciones de amplificación en cadena utilizando diversos *primers* específicos para cada una de las variantes de las cadenas Vβ. El panel se encontraba previamente diseñado y las condiciones de las reacciones se determinaron mediante análisis bioinformáticos llevados a cabo por la Est. Ornella Denise Flores. Las secuencias de todos los *primers* se encuentran debajo, y su denominación se corresponde con la nomenclatura de Arden et al. El diseño de la reacción implica que las variantes de las cadenas Vβ se amplifican mediante el uso de *primers forward* específicos, mientras que se utiliza un solo *primer reverse* que hibrida en una región conservada por fuera del *locus* del Vβ.

Nombre	Secuencia	Temperatura de hibridación
C *reverse*	5’ AGATCTCTGCTTCTGATGGCTC 3’	63°C
Vβ1	5’ GAACTAAACCTGAGCTCTCTG 3’	59°C
Vβ2	5’ CAGCTTCTACATCTGCAGTGC 3’	63°C
Vβ3	5’ CTGGAGTCCGCCAGCACCA 3’	68°C
Vβ4	5’ GAGCAACATGAGCCCTGAAG 3’	63°C
Vβ5A	5’ GCTCTGAGATGAATGTGAGCGCC 3’	67°C
Vβ5B	5’ GCTGAATGTGAACGCCTTGTTG 3’	65°C
Vβ6A	5’ ATCCAGCGCACACAGCAGGAG 3’	69°C
Vβ6B	5’ GAAGATCCAGCGCACAGAGC 3’	65°C
Vβ7A	5’ CTCACCTGAATGCCCCAACAG 3’	65°C
Vβ8	5’ GCCCTCAGAACCCAGGGACT 3’	67°C
Vβ9	5’ CTGGAGCTTGGTGACTCTGCTGT 3’	68°C
Vβ10	5’ GATCCAGTCCACGGAGTCAGG 3’	65°C
Vβ11	5’ CCTGGAGTCTGCCAGGCCCTC 3’	60°C
Vβ12	5’ CACTCTGGAGTCCGCTACC 3’	63°C
Vβ13A	5’ TCAGGCTGCTGTCGGCTGCTC 3’	71°C
Vβ13B	5’ TGGGGTTGGAGTCGGCTGCTC 3’	70°C
Vβ13C	5’ TCAGGCTGGAGTCGGCTGCTC 3’	70°C
Vβ13D	5’ TCAGGCTGGAGTCAGCTGCTC 3’	68°C
Vβ13E	5’ CCTCACGTTGGCGTCTGCTGT 3’	69°C
Vβ14	5’ GTCTCTCGAAAAGAGAAGAGG 3’	59°C
Vβ15	5’ CCCTAGAGTCTGCCATCCC 3’	62°C
Vβ16	5’ GTGCAGCCTGCAGAACTGGAG 3’	67°C
Vβ17	5’ CACTGTGACATCGGCCCAAAAG 3’	66°C
Vβ18	5’ GGATCCAGCAGGTAGTGCG 3’	64°C
Vβ19A	5’ ATCCTGTCCTCAGAACCGGGA 3’	66°C
Vβ20	5’ CCTCCTCAGTGACTCTGGC 3’	63°C
Vβ21	5’ ATCCAGCCTGCAGAGCTTGG 3’	66°C

Vβ22	5’ GAAGATCCGGTCCACAAAGCTG 3’	65°C
Vβ23A	5’ CTGAACTGAACATGAGCTCCTT 3’	62°C
Vβ24	5’ CATCCGCTCACCAGGCCTG 3’	67°C
Vβ25	5’ TCCCAAATTCACCCTGTAGCCTTG 3’	66°C

Tabla 18. Listado de *primers* específicos para la amplificación de las secuencias de las variantes de cadena Vβ. Se muestran los nombres de cada *primer*, las secuencias y las temperaturas de hibridación correspondientes.

El perfil de ciclado utilizado para dichos *primers* se muestra en la **Tabla 19.**

Desnaturalización inicial	**94°C**	**3 minutos**	**1 ciclo**
Desnaturalización	**94°C**	**45 segundos**	**40 ciclos**
Hibridación	**55°C**	**30 segundos**	
Extensión	**72°C**	**1 minuto**	
Extensión final	**72°C**	**10 minutos**	**1 ciclo**
Cooling	**4°C**	**∞**	

Tabla 19. Perfil de ciclado para amplificar las secuencias de las variantes de cadenas Vβ. Se muestran las temperaturas, tiempos de incubación y ciclos correspondientes a cada paso. Los tamaños de amplificación varían entre 140 y 346 pb.

Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8% siguiendo las indicaciones detalladas anteriormente.

Diseño de paneles de *primers* y bioinformática

Con la finalidad de diseñar los paneles de *primers* para evaluar la variación en la presencia de ARN mensajero codificante para cada tipo de cadena Vβ, se llevaron a cabo análisis bioinformáticos con varias finalidades. En principio se determinaron las condiciones de reacción y se caracterizaron los tamaños e identidades de cada uno de los productos que se generarían tras la PCR mediante el uso de la herramienta *Primer* blast.

Por otro lado, se determinó la homología entre los Vβ murinos y humanos con la finalidad de predecir los clones humanos que se verían afectados utilizando determinados superantígenos virales que no habían sido caracterizados previamente en su acción con células humanas. Para ello se accedió a las secuencias murinas de referencia desde la base de datos del IMGT utilizando la nomenclatura según Arden et al. Posteriormente se empleó la herramienta BLAST para realizar alineamientos entre cada una de las secuencias de los Vβ murinos con los Vβ humanos. Los parámetros para cada búsqueda fueron los predeterminados a excepción que en lugar de utilizar megablast se utilizó el algoritmo BlastN que genera alineamientos entre secuencias no tan similares. Se tuvieron en cuenta aquellas homologías que presentaban un *E-value* menor a 10^{-4}. En el caso de Vβ 8.2 y Vβ11 los resultados no están disponibles para todos los Vβ murinos que hay de cada uno de ellos (4 y 5 variantes respectivamente), por ello se seleccionaron solo 2.

Vehiculización de superantígenos virales en VLPs producidas en células de mamífero

Materia viva

Para llevar a cabo la caracterización del sistema de expresión y la producción de VLPs se utilizó la línea celular HEK293T cuyos detalles y mantenimiento se describen en los **Materiales y Métodos compartidos entre todos los capítulos**.

Transfección de células eucariotas animales

La transfección con las construcciones plasmídicas pZ-SAgs se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito anteriormente. En este caso se utilizaron placas de 6 pocillos para la caracterización de la expresión o 2 frascos de cultivo T75 (BIOFIL) para cada construcción. Para cada lote siempre se consideraron los controles correspondientes de control positivo (pZ-eGFP), cuya expresión puede verificarse por microscopía de fluorescencia y *mock* como control negativo en el cual se siguió el mismo protocolo de transfección, pero no se agregó material genético.

Para los ensayos de expresión se aguardaron 48 horas post transfección y se recuperaron las monocapas celulares para llevar a cabo análisis moleculares como electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes y *Western Blotting*.

Purificación de VLPs

La purificación de las VLPs resultantes tras la expresión de las construcciones en células HEK293T se llevó a cabo como se detalló anteriormente. En el caso de las $VLPs_{Z\text{-}SAgs}$, se utilizaron al menos 2 frascos de cultivo T75 para cada plásmido para obtener cada lote de VLPs.

Validación y cuantificación de VLPs

Durante cada lote de producción de VLPs se llevaron a cabo siempre los controles correspondientes: verificación de la calidad y cantidad del ADN a transfectar, control de la expresión de eGFP mediante microscopía de fluorescencia, examen de la acción de la proteinasa K y comprobación de la expresión de Z mediante *Western Blotting*.

Para poder avanzar a los ensayos de actividad biológica de las $VLPs_{Z\text{-}SAgs}$ se consideró que tanto el ensayo de protección a proteinasa K como la inmunodetección utilizando un suero anti Z de las fracciones de las VLPs purificadas sean satisfactorias. Posteriormente, se realizó una cuantificación de las VLPs mediante el método de Bradford, como se detalló previamente. Todos los lotes de VLPs que hayan superado los controles detallados anteriormente fueron almacenados a 4°C hasta su momento de uso.

Caracterización de la actividad biológica de las VLPs

Ensayos *in vitro* utilizando sangre periférica de dadores sanos

Declaración de ética para el uso de muestras

Con el fin de utilizar el modelo *in vitro* más fisiológico posible, se realizaron cultivos primarios a partir de muestras de sangre venosa periférica de dadores voluntarios sanos, que fueron obtenidas en las instalaciones de la Universidad Nacional de Quilmes tras la firma del consentimiento informado, de acuerdo con la versión 1 del protocolo "Diseño y desarrollo de una terapia contra linfomas y leucemias basada en superantígenos virales del MMTV", aprobado por el Comité de Ética del Hospital del Cruce mediante el dictamen 0022/2024. Las extracciones fueron realizadas por el Bioq. Alejandro Castello o la Tec. Cynthia Gulino en la sala de serología de la Planta de Servicios Biotecnológicos de la Unidad de Aplicaciones Biotecnológicas de la Salud.

Purificación de células mononucleares de sangre periférica

Las muestras de dadores sanos (aproximadamente 15 mL) fueron diluidas al medio con solución fisiológica estéril y sembradas sobre un colchón de 12 mL de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare) en tubos cónicos de 50 mL. Luego de una centrifugación a 400*xg* a temperatura ambiente durante 30 minutos sin freno en una centrífuga J2-MC (Beckman Coulter) utilizando el rotor basculante 7.5, se recuperó la nube de células mononucleares con una pipeta Pasteur estéril. Las células se lavaron 2 veces con PBS 1X estéril y luego se resuspendieron en 2 mL de medio RPMI completo. Posteriormente se realizó un recuento de células utilizando azul de tripán y una cámara de Neubauer.

Tinción de células mononucleares con CFSE

Con el fin de caracterizar la proliferación de las células mononucleares durante los ensayos de actividad biológica con las $VLPs_{Z\text{-}SAgs}$, una vez contadas las células mononucleares, se procedió a teñir las mismas utilizando el mismo protocolo que se detalló anteriormente.

Cultivos primarios de PBMCs de dadores sanos

Una vez purificadas y contadas las células mononucleares, se procedió a la siembra en cada uno de los *wells* de las placas de 96 pocillos para llevar a cabo los ensayos de actividad biológica. En cada pocillo se colocaron 10^5 células con el fin de evitar el agotamiento del medio de cultivo tras varios días de ensayo.

Los tratamientos utilizados fueron: $VLPs_{Z\text{-}mtv7}$, $VLPs_{Z\text{-}BALB14}$, $VLPs_{Z\text{-}BALB2}$, $VLPs_{Z\text{-}LA}$, $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ y PBS estéril. Las cantidades utilizadas como estímulo fueron de 200 ng para cada pocillo. Para cada tratamiento se realizaron 3 series independientes de pocillos: células

teñidas con CFSE para evaluar proliferación, células sin teñir para analizar apoptosis posteriormente y células sin teñir para guardar los *pellets* de células y analizar la expresión de ARN mensajeros posteriormente. Además, para cada serie y tratamiento se utilizó un pocillo por día durante 7 días, con la finalidad de caracterizar la cinética del efecto biológico.

Microscopía de campo claro

Durante los ensayos de actividad biológica se analizó la morfología celular en los distintos tratamientos tras observación ante una lupa invertida. Se tomaron fotos de los campos observados utilizando los objetivos de 10X y 20X mediante el uso de la cámara de un teléfono celular inteligente (Samsung).

Tinción con ioduro de propidio u 7-AAD y Anexina-V

Cumplidos los períodos de tiempo establecidos en el diseño experimental de cada ensayo, se procedió a recuperar las células de cada uno de los pocillos y colocarlos en tubos de citometría (Beckton Dickinson). Los tubos fueron sometidos a una centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y se descartaron los sobrenadantes. Posteriormente, los *pellets* celulares se lavaron dos veces con PBS 1X estéril y luego se resuspendieron en 100 µL de *buffer* de unión 1X diluido inmediatamente antes (BD). A continuación, se agregó 1 µL de Anexina-V-FITC o Anexina-V-PE (BD) según corresponda y 2 µL de Ioduro de Propidio 50 µg/mL o 1 µL de 7-aminoactinomicina D (7-AAD) 50 ng/µL. Luego de 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, se procedió a analizar las muestras marcadas mediante citometría de flujo.

Citometría de Flujo

Una vez preparadas las células para ser analizadas mediante citometría de flujo, se utilizó un FACSCalibur (BD) para analizar los perfiles de tamaño, granularidad y emisión de fluorescencia de las mismas. En todos los casos el análisis se redujo a la región de los linfocitos de acuerdo con su perfil de tamaño y granularidad.

En el caso de marcaciones con CFSE, una vez lavadas y resuspendidas en 200 µL de isoflow (BD), se procedió a analizar la emisión de fluorescencia en el canal FL1 utilizando un seteo establecido por los controles sin marca.

En el caso de dobles marcaciones Anexina-V-FITC - Ioduro de Propidio, se analizó la emisión de fluorescencia en los canales FL1 y FL3, respectivamente. Para ello se utilizó un seteo establecido por los controles sin marca y simples marcas.

En el caso de dobles marcaciones 7-AAD/ Anexina-V-PE, se analizó la emisión de fluorescencia en los canales FL1 y FL2, respectivamente. Para ello se utilizó un seteo establecido por los controles sin marca y simples marcas.

Los datos fueron posteriormente analizados mediante el uso del software FlowJo VX.

Estadística

Para la generación de los gráficos se utilizó el software GraphPad Prism 8.0.2 (Graphpad). Al carecer de réplicas no se llevaron a cabo análisis estadísticos.

Expresión y purificación de superantígenos virales en sistemas bacterianos

Materia viva

Los ensayos de expresión de proteínas recombinantes fueron desarrollados utilizando la cepa bacteriana *E. coli* DE3 Rosetta cuyo genotipo es F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3) pRARE (CamR). Esta variante se encuentra derivada de la cepa BL21 y posee un diseño particular para mejorar la expresión de proteínas de origen eucariótico que contienen codones raramente utilizados en *E. coli*. Para ello, porta un plásmido que confiere resistencia a cloranfenicol y que codifica para los ARN de transferencia AGG, AGA, AUA, CUA, CCC y GGA, que además posee el gen de la lisozima de T7. DE3 indica que la cepa es un lisógeno de λDE3 y como consecuencia porta una copia cromosomal de la T7 ARN polimerasa bajo el control del promotor lacUV5.

Con el fin de utilizar dichas bacterias como sistema de producción de proteínas heterólogas se produjeron competentes térmicas de las mismas, utilizando el mismo protocolo que ha sido descrito anteriormente para la cepa *E.coli* XL1 BLUE.

Transformación de bacterias *E. coli Rosetta*

Las cuatro construcciones plasmídicas pET-28a-SAgs fueron transferidas a bacterias *E. coli Rosetta* competentes térmicas siguiendo protocolos descritos anteriormente. Luego de sembrar las mismas en placas de agar sólido con kanamicina y cloranfenicol, se procedió a corroborar que las colonias seleccionadas efectivamente portaban la construcción, mediante la técnica de PCR de colonias utilizando los *primers* universales T7 prom y T7 ter. Finalmente se seleccionó una única colonia por construcción y se guardaron *stocks* de las mismas.

Prueba de expresión a pequeña escala

Se produjeron cultivos de 5 mL de LB conteniendo kanamicina y cloranfenicol, inoculados con cultivos saturados tras crecimiento durante toda la noche de las colonias seleccionadas de *E.coli Rosetta* portando las cuatro construcciones pET-28-SAgs cada una por separado. Una vez lograda una Densidad Óptica a 600 nm (DO_{600}) entre 0.5 y 0.9, se indujo la expresión tras el agregado de IPTG a una concentración final de 1 mM. Como control "no inducido", también se utilizó un duplicado de cada cultivo al cual no se le agregó IPTG. Se tomaron alícuotas de las bacterias de todos los cultivos para analizar la expresión a distintos tiempos: 0 horas, 2 horas y 4 horas.

Los *pellets* bacterianos fueron separados tras centrifugación a 13200 rpm durante 1 minuto y se descartaron los sobrenadantes. Posteriormente, los *pellets* celulares fueron mantenidos a -20°C hasta el análisis de los mismos. Inicialmente los ensayos se llevaron a cabo en condiciones estándar: agitación de 200 rpm, 37°C e inducción con IPTG concentración final 1mM.

El análisis de la expresión de proteínas se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 12% m/v en condiciones desnaturalizantes siguiendo el protocolo que se indicó previamente. Para estandarizar la cantidad de bacterias sembradas en cada calle a pesar que las mismas siguen creciendo durante el ensayo, se utilizaron 0.2 unidades de DO_{600} en cada calle.

Para verificar la correcta expresión y la identidad de las proteínas recombinantes, se llevó a cabo un *Western Blotting* de las muestras bacterianas utilizando un anticuerpo contra el *tag* de histidina, siguiendo los protocolos que se detallaron previamente.

Optimización de la expresión a pequeña escala

Con la finalidad de determinar las condiciones óptimas de expresión y purificación de las cuatro variantes de las proteínas, se analizaron diversas variaciones a las condiciones estándar:

- expresión durante toda la noche (16 horas) induciendo con una concentración de IPTG 100 µM.
- expresión a 16°C y 22°C.

Siempre se mantuvo la agitación de 200 rpm, se tomaron muestras a tiempos 0 (previo a la inducción), 2 horas y 4 horas de expresión. Además, como control se utilizaron cultivos “no inducidos”. Los resultados fueron obtenidos como se detalló anteriormente, realizando electroforesis de proteínas y comparándolos con los patrones de expresión obtenidos utilizando las condiciones estándar.

Análisis de solubilidad a pequeña escala

Una vez determinadas las condiciones óptimas de expresión, se analizó la solubilidad de las proteínas recombinantes tras lisis de las bacterias. Para ello, se resuspendieron los *pellets* bacterianos correspondientes a 1 mL de cultivo en 500 µL de *buffer* de lisis y se sonicó en hielo durante 6 ciclos de: 10 segundos encendido y 1 minuto apagado, a una intensidad del 50%. Se utilizó un sonicador de punta gentilmente prestado por el Laboratorio de Investigaciones en Biotecnología Sustentable de la Universidad Nacional de Quilmes. Todo el proceso se realizó con sumo cuidado de no elevar la temperatura, utilizando hielo y recesos necesarios. Además, se aseguró que la punta del sonicador quede en el centro del líquido, sin tocar las paredes del tubo. Los Joules totales entregados a las bacterias fueron de

aproximadamente 270 considerando *pellets* de aproximadamente 1 mL. Posteriormente se procedió a centrifugar durante 10 minutos a 13200 rpm a 4°C para separar las fracciones solubles e insolubles. Las mismas se fraccionaron en tubos diferentes y fueron utilizadas como muestras para observar el patrón de proteínas de cada una en geles de poliacrilamida 12% m/v desnaturalizantes.

Con la finalidad de evaluar si mejora la solubilidad de las proteínas, se analizó el efecto del agregado de trehalosa al *buffer* de lisis.

Producción de proteínas recombinantes

Una vez determinadas las condiciones óptimas de expresión y purificación para cada proteína, se llevó a cabo la producción a mayor escala de las mismas, considerando un volumen de cultivo de 250 mL. Luego del tiempo determinado para la expresión, se obtuvieron los *pellets* bacterianos tras centrifugación del cultivo en tubos cónicos de 50 mL y a una velocidad de 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C en una centrífuga Beckman Coulter J2-MC utilizando el rotor JA-14. Tras la centrifugación se descartó el sobrenadante y los *pellets* bacterianos fueron almacenados a -20°C hasta ser utilizados.

Los *pellets* fueron luego resuspendidos en 5 mL de *buffer* de lavado Tris y sometidos a sonicado en hielo, completando 6 ciclos de: 10 segundos encendido y 1 minuto apagado, a una intensidad de 50%, otorgando una energía total de 483 Joules. Posteriormente se procedió a separar las fracciones solubles e insolubles mediante centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C, utilizando una microcentrífuga de mesada. Dado que en general las proteínas se encontraban en la fase insoluble, se procedió a purificar, solubilizar y romper los cuerpos de inclusión.

Fraccionamiento y solubilización de cuerpos de inclusión

Las fracciones insolubles obtenidas como se menciona arriba fueron resuspendidas en 5 mL de *buffer* de lavado con tritón. Se sonicó por cuatro ciclos iguales a los utilizados previamente y se centrifugó durante 10 minutos a 14000 rpm a 4°C. Luego se resuspendió el *pellet* obtenido en 5 mL de *buffer* de lavado de urea. Nuevamente, se sonicó durante 4 ciclos iguales a los utilizados previamente y se centrifugó durante 10 minutos a 14000 rpm a 4°C. El *pellet* obtenido fue resuspendido en 5 mL de *buffer* de lavado Tris. Se sonicó nuevamente por un total de cuatro ciclos, iguales a los utilizados previamente y se centrifugó durante 10 minutos a 14000 rpm a 4°C. Este último *pellet* fue almacenado a -20°C hasta ser utilizado.

Para solubilizar los cuerpos de inclusión se trabajó a temperatura ambiente para evitar la cristalización de la urea. Los *pellets* almacenados previamente fueron resuspendidos en 5 mL de *buffer* A, al que se le añadió inmediatamente antes de su uso DTT y también PMSF como inhibidor de proteasas. Se mantuvo en agitación por un periodo entre 30 y 60 minutos

a temperatura ambiente utilizando un agitador magnético. Posteriormente se centrifugó durante 15 minutos a 14000 rpm a 4°C y se recuperó la fracción soluble. Dichas fracciones fueron utilizadas para la purificación de las proteínas recombinantes. Todas las fracciones restantes en cada uno de los pasos fue guardada y ninguna se descartó, con la finalidad de analizar la presencia de las proteínas deseadas en cada una de las mismas.

Purificación por cromatografía de afinidad

Dado que las proteínas recombinantes se hallan fusionadas a un *tag* de histidina en su región carboxilo terminal, se procedió a la purificación de las mismas utilizando la columna de Níquel HisTrap (Cytiva). El proceso se realizó manual, utilizando jeringas de 10 mL.

Inicialmente se analizó la correcta coloración de la matriz de la columna, para evitar que haya problemas debido a que el níquel capturado en la resina no se encuentre en el estado que corresponde. Todas las soluciones utilizadas fueron filtradas previamente utilizando un filtro de 0.45 µm y además se colocó otro filtro de 0.45 µm en el extremo de ingreso de muestras a la columna. Para comenzar con la purificación se lavó la columna con 10 mL de agua miliQ y se equilibró la misma con 10 mL del *buffer* A. Se inyectó 1 mL de la muestra y se lavó con 15 mL de *buffer* A. Posteriormente se lavó con 10 mL de una mezcla de 90% *buffer* A, 10% *buffer* B. Finalmente se eluyó con *buffer* B y se colectaron fracciones de 500 µL del eluato. Todas las otras fracciones también fueron recuperadas y almacenadas a -80°C hasta analizarlas. El análisis del proceso de purificación se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 12% m/v, como se describió anteriormente.

Eliminación de urea mediante diálisis en dos pasos

Considerando que se desea evaluar la actividad biológica de las proteínas recombinantes en condiciones de cultivos celulares eucariotas y que además su función depende del plegamiento de las mismas, se procedió a eliminar la urea de las preparaciones mediante diálisis. Para ello, se colocaron las muestras a dializar dentro de membranas de diálisis selladas con broches plásticos utilizando la membrana estándar de celulosa (Fisher Scientific), que posee un *cutoff* de 12- 14 kDa. Se colocaron entre 1 y 2 mL de las fracciones de purificación seleccionadas y los paquetes fueron sumergidos en 500 mL de solución de diálisis. La diálisis se realizó durante toda la noche a 4°C con agitación moderada y al día siguiente se realizó un recambio de la solución, manteniendo el segundo paso de diálisis durante 6 horas. Finalmente se recuperó la fracción dentro de la membrana de diálisis y la misma se sometió a una centrifugación de 13200 rpm durante 15 minutos, a 4°C para separar las fracciones solubles e insolubles. Los resultados se observaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.

Eliminación de urea mediante diálisis escalonada

Con la intención de obtener las proteínas recombinantes en la fracción soluble, se llevó a cabo un protocolo de diálisis escalonada. Para ello, se utilizó la misma membrana de diálisis y los mismos volúmenes de muestra dentro del caramelo, pero el proceso se llevó a cabo en 6 pasos. Cada paso constó de la incubación de 500 mL de la solución de diálisis II y la incubación por 1 hora con agitación moderada a 4°C. Luego del primer paso se retiró el 30% del volumen de la solución de diálisis y se reemplazó con solución de diálisis fresca. Los pasos posteriores constaron de retirar el 50% del volumen de la solución de diálisis y reemplazarla con solución fresca. Al finalizar el proceso, se recuperó el contenido del caramelo y se analizaron las fracciones solubles e insolubles tras centrifugación como se detalló previamente.

Evaluación del efecto del pH sobre la solubilidad de las proteínas recombinantes

Para poder determinar si existe una relación entre el pH del *buffer* en el que se encuentran los SAgs-HT con su solubilidad, se procedió a tomar una de las fracciones de purificación de mtv-7-HT (Alícuota #16). Se determinó la concentración de la proteína mediante el método de Bradford. Posteriormente se determinó el pH original de la proteína utilizando tiras reactivas (Whatman) y se llevaron a cabo diluciones 1/10 utilizando distintas soluciones *buffer*: solución amortiguadora HCl/KCl 0.1M pH 2.0; solución amortiguadora Acetato de sodio 0.1 M pH 4.5; solución amortiguadora Tris/HCl 0.1 M pH 6.6 y solución amortiguadora Tris/HCl 0.1 M pH 8.0. Se tomaron 20 µL de la proteína y se llevaron a volumen final 200 µL con las soluciones que se detallan arriba. Se mantuvo en agitación durante 30 minutos y posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a velocidad máxima en una centrífuga de mesada para separar las fracciones soluble e insoluble.

Con la finalidad de equiparar las proporciones entre ambas fracciones, se precipitaron las proteínas de las fracciones solubles utilizando Ácido TriCloro acético (ATC). Brevemente, se utilizó una solución *stock* de ATC 50% m/v y se llevó a concentración final 13% m/v. Las muestras se incubaron en hielo durante 30 minutos y luego se centrifugaron durante 10 minutos a velocidad máxima a 4°C. Se descartaron los sobrenadantes y se repitió el paso de centrifugación con las mismas condiciones. Luego se lavó 2 veces con acetona fría, añadiendo 1 volumen (200uL) a cada microtubo, se homogeneizó utilizando un vórtex y se volvió a centrifugar a 4°C por 10 minutos a velocidad máxima. Finalmente se dejó secar el *pellet* al aire durante 10 minutos.

Para evaluar el efecto del pH sobre la solubilidad se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida 12% m/v preparando las muestras de la siguiente manera añadiendo 5 µL de *buffer* de siembra, 10 µL de agua ultrapura y 5 µL de *Buffer* Tris 1M pH 8,3.

MATERIALES Y MÉTODOS DEL CAPÍTULO VI

Generación de las herramientas de vehiculización y expresión

Diseño *in silico* de las herramientas

Dado que era necesario contar con diversas construcciones plasmídicas para llevar adelante el proyecto de investigación, se diseñaron cuatro construcciones para las dos estrategias propuestas. Por un lado, se planificó la vehiculización del SAg BALB2 en VLPs derivadas del sistema AP205 y por otro lado la vehiculización del SAg BALB2 en nanojaulas sintéticas utilizando el sistema SpyCatcher/SpyTag. Se seleccionó el SAg BALB2 considerando su clonalidad más reducida y con la intención de facilitar las pruebas de concepto para caracterizar la especificidad de su actividad biológica. Además, ante la posibilidad económica de generar dos variantes se decidió sintetizar el marco abierto de lectura completo de BALB2, idéntico a la secuencia obtenida de los clones caracterizados del **Capítulo IV** y por otro lado una versión más corta a la que nos referiremos como "CT" porque corresponde al dominio carboxilo terminal del marco abierto de lectura desde el motivo RKRR hacia el 3'.

Para el sistema AP205 es necesario contar con las secuencias nucleotídicas de los antígenos a vehiculizar en un plásmido de clonado convencional, cuyo *Multiple Cloning Site* (MCS) esté flanqueado por las enzimas PstI y NcoI que permiten la transferencia del inserto en forma direccionada al vector de expresión, llamado pAPKP. Un resumen de la estrategia de clonado se puede observar en la **Sección III, Capítulo VI, Figura 60**.

Para el sistema de vehiculización en nanojaulas sólo es necesario contar con los marcos abiertos de lectura en un plásmido que permita la expresión de los antígenos SpyTag en el sistema de expresión elegido, que en este caso al ser bacteriano se seleccionó el mismo que se utilizó en el **Capítulo IV**: pET28-a (+). Dicho plásmido permite la purificación de las proteínas expresadas mediante el uso de resinas de níquel ya que ofrece la posibilidad de fusionar el marco abierto de lectura a un *tag* de histidinas en el amino terminal o en el carboxilo terminal. En este caso se seleccionó una estrategia de uso del *tag* de histidinas en el carboxilo terminal ya que la secuencia SpyTag se halla en la región amino terminal, pero además se incorporó una secuencia de reconocimiento de trombina entre el fin del marco abierto de lectura de BALB2 y el *tag* de histidinas para obtener una versión más limpia de las proteínas de fusión.

Obtención de las construcciones plasmídicas

Las cuatro construcciones que portan el marco abierto de lectura de BALB2 en sus dos versiones fueron solicitadas para su síntesis a Twist Biosciences. Al llegar en forma liofilizada fueron resuspendidas a una concentración final de 20 ng/µL.

La construcción para la generación de las nanojaulas sintéticas fue solicitada desde Addgene, cuyo nombre es SpyCatcher003-mi3 (número de catálogo 159995). La construcción fue generada de forma artificial utilizando la 2-ceto-3-desoxi-fosfoglutanato algolasa de la bacteria *Thermotoga maritima* (Rahikainen et al., 2021). Las partículas derivadas de la expresión de dicho plásmido en bacterias *E. coli* son nanojaulas cubiertas de la proteína SpyCatcher003 que es una versión mutada de la original para reducir la neutralización de las mismas por anticuerpos preexistentes en seres humanos. Sin embargo, mantiene las propiedades de interacción y creación de una unión isopeptídica espontánea al reconocer a su contraparte, SpyTag. La construcción plasmídica fue recibida en una punción bacteriana de bacterias *E. coli* DH5α sobre agar sólido. A partir de dicho material se realizó una siembra por agotamiento en una placa de agar sólido con kanamicina. A partir de ello se utilizó una colonia individual para inocular medio líquido con antibiótico y posteriormente realizar miniprep utilizando el kit Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen).

Clonado Molecular

Materia viva

Para llevar a cabo las etapas de clonado molecular se utilizó la cepa bacteriana *E. coli* 10G, genotipo F^{-} mcrA ∆(mrr-hsdRMS-mcrBC) endA1 recA1 φ80dlacZ∆M15 ∆lacX74 araD139 ∆ (ara, leu)7697 galU galK rpsL (StrR) nupG λ− tonA. Esta cepa posee resistencia a estreptomicina y es deficiente para *RecA*, lo que mejora la estabilidad del inserto. Con ese fin, la cepa fue sometida a un protocolo de generación de competencia eléctrica (Sambrook, J., Maniatis, T., & Fritsch, 1989).

Vectores de expresión procariotas

- ➔ pET28-a (+). Este vector es idéntico al utilizado en el **Capítulo IV** y el mapa detallado del plásmido se muestra en la **Figura 16.**
- ➔ pAPKP. Este vector ha sido desarrollado previamente por el Dr. David Peabody y el mapa detallado del plásmido puede observarse en la **Figura 17**.

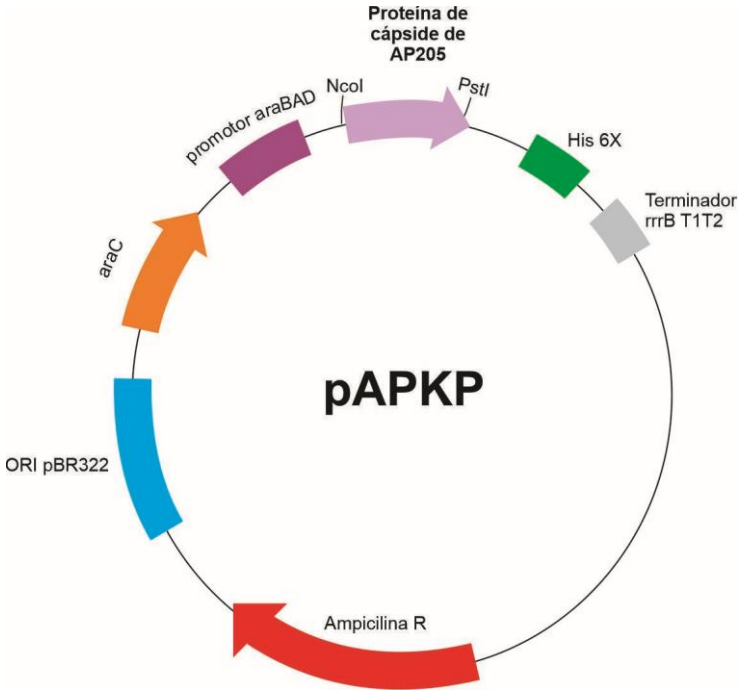


Figura 17. Esquema representativo de la construcción pAPKP. El plásmido fue generado por el grupo liderado por el Dr. David Peabody y gentilmente cedido al grupo de investigación liderado por el Dr. Chackerian. La proteína de cápside de AP205 se incorporó en un plásmido derivado de pBAD-topo-THIO. Eso permite la expresión de la proteína de la cápside de dicho bacteriófago bajo el promotor de arabinosa. La construcción otorga resistencia para ampicilina, posee un origen de procariota (pBR322) y además cuenta con la posibilidad de expresar las proteínas fusionadas a un *tag* de histidinas.

Transformación de bacterias mediante choque eléctrico

Las construcciones sintetizadas fueron transferidas a las bacterias *E. coli* 10G electrocompetentes mediante un protocolo de transformación eléctrica. Para ello, se colocaron 10 µL de bacterias junto con 1 µL de las mezclas de ligación, y se causó un *shock* eléctrico con el equipo MicroPulser (BIORAD). Luego de 1 hora de recuperación en 1 mL de medio LB líquido sin antibióticos, se dispersó la totalidad de las bacterias en placas de medio sólido LB con los antibióticos correspondientes en cada caso.

Transferencia de insertos a los vectores de expresión

Con la finalidad de generar las construcciones finales pAPKP-BALB2 y pAPKP-CT, los plásmidos pTwist-BALB2 y pTwist-CT fueron digeridos con las enzimas PstI y NcoI (NEB). También se realizó la digestión doble del vector final de expresión, pAPKP. Posteriormente los productos de digestión fueron sometidos a electroforesis preparativas en geles de agarosa 1% m/v y los fragmentos esperados fueron escindidos. El material genético fue purificado de los tacos de agarosa utilizando el kit QIaquick gel extraction (Qiagen). Se cuantificó la concentración del ADN purificado mediante el uso de un nanodrop.

Se prepararon dos mezclas de ligación utilizando 50 ng de vector, considerando un R de 5:1. Las ligaciones se realizaron durante toda la noche a 4°C, utilizando la enzima T4 DNA ligasa (NEB). Al finalizar el tiempo de incubación, se inactivó la enzima incubando las mezclas de ligación a 65°C durante 10 minutos. Posteriormente, 5 µL de las mezclas de ligación fueron transferidas a las bacterias *E. coli* 10G electrocompetentes mediante un protocolo de transformación eléctrica, como se indicó previamente.

Luego de sembrar en placa de LB agar sólido con ampicilina y obtener varias unidades formadoras de colonias, se realizó una verificación de las colonias recombinantes. Para ello se comenzaron cultivos líquidos de dos colonias de cada construcción y se purificó el ADN plasmídico total utilizando el kit Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen). Para determinar la especificidad de los insertos en los vectores se realizaron mapas físicos por digestión con las enzimas PstI y NcoI (NEB) y finalmente secuenciación mediante método de Sanger, tercerizado a GeneWiz utilizando los *primers* universales pBAD Fw y pBAD Rv.

Análisis *in silico* de las secuencias obtenidas

Una vez obtenidas, las secuencias fueron analizadas en función de los intervalos de confianza de los cromatogramas, lo que permitió realizar una depuración de los datos. Posteriormente, se alinearon los fragmentos obtenidos con los *primers forward* y *reverse* correspondientes a cada clon, lo que permitió reconstruir la secuencia final. Estas fueron luego comparadas con las utilizadas en la síntesis.

Además, a partir de las secuencias nucleotídicas se llevaron a cabo análisis bioinformáticos con respecto a las proteínas que se expresarán en cada sistema. Inicialmente se utilizó la herramienta “Translate” de Expasy Tools para transformar las secuencias nucleotídicas en aminoacídicas (https://web.expasy.org/translate/). Posteriormente se determinaron los parámetros de las proteínas de fusión resultantes utilizando la herramienta “ProtParam”, que predice los pesos moleculares y el punto isoeléctrico, entre otros parámetros (https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam). También se analizó la presencia de dominios transmembrana utilizando la herramienta HMMTOP, desarrollada por G.E Tusnády

y I. Simon (http://www.enzim.hu/hmmtop/server/hmmtop.cgi). Por último, se utilizó la herramienta NetSolP-1.0 con la finalidad de determinar la solubilidad de las mismas (https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetSolP-1.0).

Vehiculización de superantígenos virales utilizando el sistema AP205

Materia viva

Los ensayos de expresión de las construcciones para la vehiculización de BALB2 fueron desarrollados utilizando las cepas bacterianas:

➔ E. coli BL21 DE3 cuyo genotipo es fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHIo ΔEcoRI-B int: :(lacI: PlacUV5:T7 gene1) i21 Δnin5.

➔ E. coli BL21 DE3 Magic, gentilmente cedidas por la Dra. Mónica Rosas Lemus, profesora asistente de la Universidad de Nuevo México.

➔ *E. coli* DE3 C41 cuyo genotipo es F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3). Dicha cepa deriva de BL21 (DE3) y posee varias mutaciones que previenen la muerte celular a causa de la expresión de diversas proteínas tóxicas.

➔ *E. coli* DE3 Rosetta, que fue detallada previamente.

Con el fin de utilizar dichas bacterias como sistema de producción de proteínas heterólogas se utilizaron competentes eléctricas comerciales de las mismas.

Transformación de bacterias

Para avanzar en la expresión, se transformaron las construcciones plasmídicas a distintas cepas de bacterias *E. coli BL21 DE3* mediante un protocolo de electroporación. Posteriormente, se sembraron las bacterias en placas de agar sólido con los antibióticos correspondientes y algunas de las colonias obtenidas fueron seleccionadas para ser utilizadas en ensayos de expresión.

Prueba de expresión a pequeña escala

Se produjeron cultivos de 5 mL de LB conteniendo los antibióticos correspondientes (sólo kanamicina o kanamicina y cloranfenicol), inoculados con cultivos saturados tras crecimiento durante toda la noche de las colonias seleccionadas de *E. coli* portando las construcciones deseadas. Una vez lograda una DO_{600} entre 0.5 y 0.9, se indujo la expresión tras el agregado de IPTG a una concentración final de 1 mM. Como control “no inducido”, también se utilizó un duplicado de cada cultivo al cual no se le agregó IPTG. Se tomaron alícuotas de las bacterias de todos los cultivos para analizar la expresión a distintos tiempos.

Los *pellets* bacterianos fueron separados tras centrifugación a 13200 rpm durante 1 minuto y se descartaron los sobrenadantes. Posteriormente, los *pellets* celulares fueron mantenidos a -20°C hasta el análisis de los mismos. Inicialmente los ensayos se llevaron a cabo en condiciones estándar: agitación de 200 rpm, 37°C e inducción con arabinosa a una concentración final de 0,2%.

El análisis de la expresión de proteínas se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 12% m/v en condiciones desnaturalizantes siguiendo el protocolo que se indicó previamente. Para estandarizar la cantidad de bacterias sembradas en cada calle a pesar que las mismas siguen creciendo durante el ensayo, se utilizaron 0.2 unidades de DO_{600} en cada calle. Tras algunos problemas técnicos se comenzaron a preparar las muestras para la electroforesis resuspendiendo los *pellets* bacterianos con *buffer* de lisis sin DTT y sonicando durante 6 ciclos de 30'' ON + 1' OFF.

Optimización de la expresión a pequeña escala

Con la finalidad de determinar las condiciones óptimas de expresión de las VLPs, se analizaron las condiciones:

- expresión a 15°C y 25°C.
- DO_{600} cercana a 1.

Siempre se mantuvo la agitación de 200 rpm, se tomaron muestras a tiempos 0 (previo a la inducción), 2 horas y 4 horas de expresión. Además, como control se utilizaron cultivos "no inducidos". Los resultados fueron obtenidos como se detalló anteriormente, realizando electroforesis de proteínas y comparándolos con los patrones de expresión obtenidos utilizando las condiciones estándar.

Producción de VLPs

Se prepararon 100 mL de cultivos bacterianos en medio LB líquido y los antibióticos correspondientes. Se aguardó a que los cultivos lleguen a una DO600 de 0,6 y se indujo la expresión mediante el agregado de arabinosa 20% m/v hasta una concentración final de 0,2%. Luego de expresar durante toda la noche a temperatura ambiente, se obtuvieron los *pellets* bacterianos tras centrifugación de los cultivos en tubos cónicos de 50 mL y a una velocidad de 3273*xg* durante 30 minutos a 4°C en una centrífuga Beckman Coulter Allegra X-12R utilizando el rotor TA-14. Alternativamente la expresión se realizó a 37°C induciendo a DO_{600} superiores a 1,2. Tras la centrifugación se descartó el sobrenadante y los *pellets* bacterianos fueron almacenados a -20°C hasta ser utilizados.

Análisis de la solubilidad de las VLPs

Se separó una fracción de 5 mL de cada cultivo inducido y dichos *pellets* bacterianos fueron resuspendidos en 500 µL de *buffer* de lisis sin DTT y se agregaron 5 µL de Detergente de desoxicolato sódico (DOC, ThermoFisher) 5%. Se incubó 30 minutos en hielo y posteriormente se procedió a sonicar durante 5 ciclos de 10'' ON + 10'' OFF. Se agregaron 0,63 µL de $MgCl_2$ 2M (Quality Biological INC) y 0,12 µL de $CaCl_2$ 2M (Quality Biological INC). Luego de homogeneizar utilizando un vórtex se agregaron 0,5 µL de dnasa 10 mg/mL y se incubó 1 hora en hielo. Se trasvasó a tubos cónicos con rosca y se centrifugó durante 30 minutos a 4°C a 10733*xg*. Se separaron los *pellets* de los sobrenadantes y se analizó el perfil de expresión de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Además, se analizó la presencia de ARN de bacteriófagos en cada una de las fracciones mediante electroforesis en geles de agarosa.

Purificación de VLPs

Los *pellets* bacterianos de 100 mL de cultivos inducidos fueron resuspendidos en 5 mL de *buffer* de lisis sin DTT y se agregaron 50 µL de DOC 5%. Se incubó 30 minutos en hielo y posteriormente se procedió a sonicar durante 7 ciclos de 15'' ON + 15'' OFF. Se agregaron 12,5 µL de $MgCl_2$ 2M (Quality Biological INC) y 2,5 µL de $CaCl_2$ 2M (Quality Biological INC). Luego de homogeneizar utilizando un vórtex se agregaron 10 µL de dnasa 10 mg/mL y se incubó 1 hora en hielo. Se trasvasó a tubos cónicos con rosca y se centrifugó durante 30 minutos a 4°C a 10733*xg*. Se separaron las fracciones solubles en tubos de 50 mL nuevos y se adicionó sulfato de amonio para llegar a una concentración final del 70%. Aproximadamente para 10 mL de sobrenadante se utilizaron 4,5 gramos de sulfato de amonio, calculados utilizando la herramienta https://files.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm. Se solubilizó por inversión y se incubó durante 15 minutos en hielo. Los *pellets* fueron resuspendidos en 2,5 mL de SCB 1X y se almacenaron a 4°C para ser utilizados como control. Luego de los 15 minutos de incubación, se centrifugó durante 15 minutos a 4°C a 10733*xg* y se separó nuevamente el sobrenadante para almacenarlo como control a 4°C. Finalmente, el *pellet* fue resuspendido en 2,5 mL de SCB 1X y se almacenó a 4°C durante toda la noche.

Al día siguiente se avanzó con la purificación de las VLPs mediante cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna de sefarosa CL-4B (Sigma). Para ello, se retiró el exceso de líquido de la columna y se abrió el robinete. Se colocaron los 2,5 mL de muestra en la parte superior de la columna luego de asegurarse que la muestra ingresó a la columna, se agregaron 5 mL de SCB 1X y se comenzaron a recolectar fracciones. Se utilizó un colector automático de fracciones (BIORAD Modelo 2110), programado para recolectar 20 minutos por tubo, lo que equivale a fracciones de 5 mL aproximadamente. La recolección transcurrió

durante toda la noche a 4°C, recuperando aproximadamente 60 fracciones para cada construcción.

Para determinar las fracciones en las cuales se encuentran las VLPs, se realizaron electroforesis en geles de agarosa 1% m/v, sembrando todas las alícuotas pares. Las fracciones que demostraron contener ARN fueron unidas en un mismo tubo (separando por cada construcción), y se precipitaron las VLPs utilizando sulfato de amonio, a una concentración final del 70%. Luego de homogeneizar se incubó en hielo durante 15 minutos a 4°C y se resuspendió el *pellet* obtenido en PBS 1X. Finalmente se realizó una diálisis colocando el *pellet* resuspendido dentro de una membrana de diálisis *snakeskin* de *cutoff* 14 kDa (ThermoFisher) y colocando en un envase con 2 litros de PBS 1X. Este proceso se realizó sin agitación a 4°C durante toda la noche y se repitió una vez más, renovando el PBS 1X. El contenido dentro de las membranas de diálisis fue recuperado y almacenado a -20°C hasta su uso.

Caracterización de VLPs

Una vez purificadas las VLPs, las mismas fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes y geles de agarosa 1% m/v. Como referencia de tamaño y para aproximar su cantidad, en los geles de poliacrilamida se utilizó tanto el marcador de peso molecular SeeBlue Plus2 (Thermoscientific) como diferentes cantidades de lisozima de huevos de gallinas (HEL, del inglés *Hen Egg Lysozyme*). Para validar el lote de VLPs generadas mediante el sistema AP205 es necesario que el ARN observado en los geles de agarosa coincidan con las bandas proteicas, análisis realizado tras tinción de los mismos con Coomasie Blue.

Vehiculización de superantígenos virales en nanojaulas sintéticas utilizando el sistema SpyCatcher/SpyTag

Materia viva

Los ensayos de expresión de las construcciones para la vehiculización de BALB2 fueron desarrollados utilizando las cepas bacterianas:

➔ E. coli BL21 DE3 cuyo genotipo es fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHIo ΔEcoRI-B int: :(lacI: PlacUV5:T7 gene1) i21 Δnin5.

➔ E. coli BL21 DE3 Magic, gentilmente cedidas por la Dra. Mónica Rosas Lemus, profesora asistente de la Universidad de Nuevo México.

➔ *E. coli* DE3 C41 cuyo genotipo es F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3). Dicha cepa deriva de BL21 (DE3) y posee varias mutaciones que previenen la muerte celular a causa de la expresión de diversas proteínas tóxicas.

➔ *E. coli* DE3 Rosetta, que fue detallada previamente.

Con el fin de utilizar dichas bacterias como sistema de producción de proteínas heterólogas se utilizaron competentes eléctricas de las mismas.

Transformación de bacterias *E. coli* BL21

Las dos construcciones pET28a-BALB2 fueron obtenidas de las bacterias *E. coli* 10G y transferidas a distintas cepas de bacterias *E. coli* BL21 competentes eléctricas siguiendo protocolos descritos anteriormente. Luego de sembrar las mismas en placas de agar sólido con los antibióticos correspondientes, se procedió a realizar las pruebas de expresión a pequeña escala.

El plásmido SpyCatcher003-mi3 fue obtenido tras miniprep por el uso de un kit comercial de cultivos de bacterias DH5α conteniendo el plásmido. Se transformó a bacterias *E. coli* BL21 C41 y se sembró en placas de agar sólido con kanamicina.

Prueba de expresión a pequeña escala de VLPs SpyCatcher

Se produjeron cultivos líquidos de 10 mL de LB conteniendo kanamicina, inoculados con cultivos saturados tras crecimiento durante toda la noche de una colonia de bacterias E. *coli* BL21 C41 transformadas con el plásmido SpyCatcher003-mi3. Una vez lograda una DO_{600} entre 0.6 y 0.9, se indujo la expresión tras el agregado de IPTG a una concentración final de 1 mM. Se evaluó la expresión en agitación de 200 rpm y durante toda la noche, a temperaturas 37°C y a 22°C.

Los *pellets* bacterianos fueron separados tras centrifugación a 3750 rpm durante 30 minutos a 4°C y se descartaron los sobrenadantes. Posteriormente se resuspendieron los *pellets* en 1 mL de *buffer* de lisis sin DTT y se agregaron 10 µL de DOC 5%. Se incubó 30 minutos en hielo y posteriormente se procedió a sonicar durante 7 ciclos de 15'' ON + 15'' OFF. Se agregaron 1,25 µL de $MgCl_2$ 2M (Quality Biological INC) y 0,3 µL de $CaCl_2$ 2M (Quality Biological INC). Luego de homogeneizar utilizando un vórtex se agregó 1 µL de dnasa 10 mg/mL y se incubó 1 hora en hielo. Se trasvasó a tubos cónicos con rosca y se centrifugó durante 30 minutos a 4°C a 10733*xg*. Se separaron las fracciones solubles e insolubles y se almacenaron a 4°C hasta analizar mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.

Producción y purificación de VLPs SpyCatcher

Se preparó un cultivo bacteriano de 250 mL de medio LB líquido con kanamicina. Se aguardó a que los cultivos lleguen a una DO_{600} de 0,6 y se indujo la expresión mediante el agregado de IPTG a una concentración final de 1mM. Luego de expresión *overnight* a 37°C a 200 rpm, se obtuvieron los *pellets* bacterianos tras centrifugación de los cultivos en tubos cónicos de 50 mL y a una velocidad de 3273*xg* durante 30 minutos a 4°C en una centrífuga

Beckman Coulter Allegra X-12R utilizando el rotor TA-14. Los *pellets* fueron almacenados a -80°C hasta ser utilizados. La purificación de las VLPs se realizó siguiendo el mismo protocolo descripto anteriormente para la **Purificación de VLPs del sistema AP205**, utilizando cantidades proporcionales al volumen de cultivo utilizado. Se recuperaron 48 fracciones y se evaluaron las alícuotas positivas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (NuPage Bis Tris 10%, Thermofisher) y electroforesis en geles de agarosa 1% m/v teñidos con bromuro de etidio.

Las fracciones observadas como positivas fueron reunidas en un mismo tubo y concentradas utilizando un concentrador de un *cutoff* de 100 kDa (Millipore-Sigma), centrifugando durante 40 minutos a 3273*xg* a 4°C. Posteriormente se realizó una diálisis en dos pasos utilizando la membrana Snakeskin de *cutoff* 10 kDa (ThermoFisher), siguiendo los procedimientos indicados previamente.

Depleción de LPS en VLPs SpyCatcher

La preparación de VLPs purificadas y dializadas fue tratada con tritón X-114 (Sigma) a una concentración final de 1% y se incubó en hielo durante 5 minutos. A continuación, se incubó a 37°C durante 5 minutos y se centrifugó a 13200 rpm durante 2 minutos a 37°C. La fase acuosa superior se trasvasó a un tubo nuevo y se repitió el procedimiento 2 veces más. Luego se repitió el proceso, pero sin el agregado de detergente y el resultado final se almacenó a -20°C.

Microscopía Electrónica de Transmisión

La preparación de VLPs SpyCatcher fue analizada mediante microscopía electrónica de transmisión gracias a la ayuda de Tamara Howard del Departamento de Biología Celular y Fisiología de la Universidad de Nuevo México, Facultad de Ciencias de la Salud. Se utilizaron grillas de carbono tratadas con una descarga por plasma durante 30 segundos. Luego, sobre dichas grillas se incubaron 10 µL de las muestras durante 20 minutos y se lavó 3 veces durante 15/30 segundos con agua ultrapura, retirando el exceso de líquido con papel de filtro. Se realizó la tinción tras incubación durante 2 minutos de la grilla con una solución acuosa 1% de acetato de uranilo y se retiró el exceso de líquido dejando secar al aire. Finalmente se tomaron las imágenes utilizando el equipo Hitachi HT7700 operando a 80 kV, utilizando una cámara CCD de 16 megapíxeles (AMR XR-81).

Prueba de expresión a pequeña escala de los antígenos SpyTag-BALB2

Se produjeron cultivos líquidos de 5 o 10 mL de LB conteniendo sólo kanamicina o kanamicina y cloranfenicol, inoculados con cultivos saturados tras crecimiento durante toda la noche de una colonia de distintas cepas de las bacterias *E. coli* BL21 transformadas con los plásmidos pET28-SpyTag-BALB2. Una vez lograda una DO_{600} entre 0.6 y 0.9, se indujo

la expresión tras el agregado de IPTG a una concentración final de 1 mM. Se evaluó la expresión en agitación de 200 rpm y durante toda la noche, a 37°C.

Los *pellets* bacterianos fueron separados tras centrifugación a 3750 rpm durante 30 minutos a 4°C y se descartaron los sobrenadantes. Posteriormente se resuspendieron los *pellets* en 1 mL de *buffer* de lisis sin DTT y se agregaron 10 µL de DOC 5%. Se incubó 30 minutos en hielo y posteriormente se procedió a sonicar durante 7 ciclos de 15'' ON + 15'' OFF. Se agregaron 1,25 µL de $MgCl_2$ 2M (Quality Biological INC) y 0,3 µL de $CaCl_2$ 2M (Quality Biological INC). Luego de homogeneizar utilizando un vórtex se agregó 1 µL de dnasa 10 mg/mL y se incubó 1 hora en hielo. Se trasvasó a tubos cónicos con rosca y se centrifugó durante 30 minutos a 4°C a 10733*xg*. Se separaron las fracciones solubles e insolubles y se almacenaron a 4°C hasta analizar mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.

Optimización de la expresión de SpyTag-BALB2

Con la finalidad de determinar las condiciones óptimas de expresión y purificación de las dos variantes de las proteínas, se analizaron diversas variaciones a las variables consideradas como estándar:

- expresión durante 2 horas.
- DO_{600} mayor o igual a 1,5.

Siempre se mantuvo la agitación de 200 rpm, se tomaron muestras diferentes tiempos de expresión. Los resultados fueron obtenidos como se detalló anteriormente, realizando electroforesis de proteínas y comparándolos con los patrones de expresión obtenidos utilizando las condiciones estándar.

Producción y purificación de las proteínas SpyTag-BALB2

La producción de los antígenos se realizó tras inoculación de 100 mL de medio líquido con cultivos saturados de bacterias y expresión durante 2 horas a 37°C. Al finalizar el tiempo se obtuvieron los *pellets* bacterianos tras centrifugación de los cultivos en tubos cónicos de 50 mL a una velocidad de 3273*xg* durante 30 minutos a 4°C en una centrífuga Beckman Coulter Allegra X-12R utilizando el rotor TA-14. Los *pellets* fueron almacenados a -80°C hasta ser utilizados.

La obtención de los lisados bacterianos se realizó como se indica anteriormente en la prueba de expresión a pequeña escala. Las fracciones solubles e insolubles fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (NuPage Bis Tris 10%, Thermofisher).

Solubilización de cuerpos de inclusión y purificación por cromatografía de pseudoafinidad

Los *pellets* de las fracciones insolubles fueron pesados para determinar su masa y por cada gramo de tales se agregaron 3 mL de *buffer* IB. Posteriormente se sonicó durante 3

ciclos de 20'' ON + 20'' OFF. Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se centrífugó a 10000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente en una centrífuga Allegra 25R (Beckman Coulter). Se separó el sobrenadante (IB1) y el *pellet* se resuspendió nuevamente en 3 mL de *buffer* IB, se sonicó y centrifugó en las mismas condiciones. Se recuperó el sobrenadante (IB2) y se repitió el procedimiento para obtener el IB3. El *pellet* resultante fue resuspendido en 100 µL de agua ultrapura. Todas las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta ser utilizadas.

La purificación de las proteínas se llevó a cabo utilizando esferas de agarosa cubiertas de níquel (His Select Nickel Affinity Gel, Sigma). Para ello, se tomó 1 mL de dichas esferas y se centrifugaron a 2000 rpm durante 2 minutos a 4°C para retirar el etanol de almacenamiento. Se lavó dos veces con agua miliQ y posteriormente se agregó la muestra IB1, trasvasando la mezcla a un erlenmeyer de 25 mL. Se cubrió con papel aluminio y se incubó durante 1 hora a 4°C con agitación suave. Se centrifugó durante 3 minutos a 2000 rpm a 4°C y se guardó el sobrenadante como "no unido". Las esferas fueron lavadas con 10 mL de *buffer* de lavado pH 8.0 y tras la centrifugación el lavado fue almacenado como "1° lavado". Se repitió el lavado y el sobrenadante se rotuló como "2° lavado". Finalmente se adicionaron 3 mL de *buffer* de elución (pH 4.5) a las *esferas* y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, en una columna para cromatografía con placa porosa. Se recuperó el líquido, rotulando como "1° elución" y se repitió el proceso 2 veces más, obteniendo las fracciones "2° elución" y "3° elución". Todas las muestras fueron almacenadas a 4°C y se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes.

Las fracciones observadas como positivas fueron sometidas a una diálisis en dos pasos utilizando la membrana Snakeskin de *cutoff* 10 kDa (ThermoFisher), proceso llevado a cabo durante 2 horas o toda la noche a 4°C en agitación moderada. Para ello, se prepararon caramelos de diálisis con 1 mL de muestras, en 1 litro de PBS 1X. Luego de las 2 horas de diálisis se resuspendió y recuperó la mitad del volumen dializado, al cual se le agregaron 25 µL de glicerol 50% para favorecer la solubilidad.

Evaluación del efecto del DTT en la solubilidad de las proteínas SpyTag-BALB2

Todos los métodos para la purificación de las proteínas SpyTag-BALB2 fueron realizados utilizando *buffer* sin DTT y con la intención de optimizar la solubilidad, se intentó agregar DTT a *pellets* ya resuspendidos en *buffer* a una concentración final de 5mM. Luego del agregado, se dejó en agitación durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se analizó la solubilidad separando las fracciones solubles e insolubles mediante centrifugación 10 minutos a 13200 rpm a temperatura ambiente y observando el patrón de expresión de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 10%.

Conjugación de VLPs SpyCatcher con las proteínas SpyTag-BALB2

Dado que la unión entre SpyCatcher y SpyTag es espontánea, solo es necesario incubar ambos componentes en el mismo tubo. Dicho procedimiento se llevó a cabo en agitación suave a 4°C durante toda la noche. Luego, se analizó la presencia de las especies conjugadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes.

Sección III: Resultados y discusión

CAPÍTULO III: CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA CELULAR DE VLPS$_{Z-EGFP}$

INTRODUCCIÓN

Virus-like particles y su destino inmunológico

Las VLPs poseen una diversidad de características deseables para ser utilizadas para el desarrollo de vacunas profilácticas y terapéuticas. Como se abordó anteriormente, su tamaño, geometría y composición hace que sean grandes estimuladoras del sistema inmunológico de manera integral. Las VLPs en general son más inmunogénicas que los antígenos como subunidad o las proteínas recombinantes y pueden inducir tanto respuestas humorales como celulares (Palladini et al., 2018). Dichas partículas pueden administrarse de forma intranasal, intravaginal, rectal, oral, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal e intramuscular (Ball et al., 2017; Bessa et al., 2008; Fraillery et al., 2009; Hunter et al., 2011; Kim et al., 2019; Meyer et al., 2019; Serradell et al., 2019). Además, dado que generalmente son capaces de inducir una adecuada respuesta inmunológica en ausencia de adyuvantes, también pueden inocularse de forma intravenosa (Ruzzi et al., 2022; Temchura et al., 2014).

Su pequeño tamaño (20-200 nm) facilita su ingreso al sistema linfático y su drenaje directo a los ganglios linfáticos como partículas libres (Young et al., 2015). Una vez presentes en los ganglios linfáticos las VLPs son capturadas por CDs residentes o linfocitos B. Luego, las VLPs son internalizadas, sus epítopes son procesados y presentados en MHCI y MHCII de CPAs que interactúan con linfocitos T CD4 y CD8 para activarlos. Además, las VLPs podrían llegar a los ganglios linfáticos transportadas por CDs migratorias que las capturaron en el sitio de inyección (Manolova et al., 2008).

Por otro lado, luego de ingresar al seno subcapsular de los ganglios linfáticos las VLPs pueden difundir a las regiones foliculares mediante pequeños poros (0,1-1 μM) en la base del seno, donde ocurre la interacción entre los antígenos y los linfocitos B *naïve*. El tamaño de dichos surcos es lo suficientemente grande como para permitir que las VLPs ingresen fácilmente por lo que podrían entrar en la región de la corteza en su forma libre y alcanzar la región de la paracorteza donde se encuentran mayormente los linfocitos T *naïve* circulantes (Cubas et al., 2009).

Evaluación de respuestas celulares

Al considerar el objetivo de prevenir o tratar diversas patologías es necesario verificar que las formulaciones utilizadas sean eficaces y seguras en cada caso. En general la eficacia de las vacunas e inmunoterapias se determina tras ensayos utilizando muestras de sangre. La cuantificación de anticuerpos en dichos sueros es relativamente simple y como se puede realizar mediante la metodología de ELISA, se pueden analizar un gran volumen de muestras en simultáneo, pero además en forma específica y sensible. Sin embargo, hay que considerar

que la presencia de anticuerpos puede no tener un correlato de protección ya que dependerá de las características de la patología en juego y de la información disponible al respecto.

Uno de los eventos más recientes que hemos transitado en los cuales se volvió a dar la discusión de cómo evaluar las respuestas inmunológicas fue la pandemia causada por COVID-19. Antes que existan vacunas disponibles para prevenir los cuadros graves de la enfermedad, se encontró que los pacientes severos tenían grandes títulos de anticuerpos, incluso neutralizantes, pero de todas formas no lograban resolver la infección. Tras estudios de individuos con inmunodeficiencias adquiridas o heredadas queda claro que mientras que la deficiencia de anticuerpos aumenta la susceptibilidad para infectarse, la deficiencia de células T implica la incapacidad de controlar al patógeno y por lo tanto resolver la infección (Pollard & Bijker, 2021). Es por ello que surgió la necesidad de evaluar las respuestas celulares que estaban ocurriendo en dichos casos, que permitieron proponer tratamientos exitosos como el uso de sustancias inmunosupresoras, como la dexametasona.

Cuando las vacunas ya estuvieron disponibles, también fue relevante evaluar la respuesta celular, porque a pesar de la existencia de una gran variedad de ensayos que determinaban la presencia de anticuerpos en muestras de suero, era desconocido el valor de corte que permitía definir a partir de cuando la persona se encuentra protegida contra el SARS-CoV-2. En este sentido, las lecciones aprendidas luego de la pandemia, entre otras, permiten darle la relevancia que corresponde a las respuestas celulares ya que dichos estudios permitieron respaldar acciones importantes para definir estrategias de salud pública que han logrado que el mundo salga de la emergencia sanitaria.

Antecedentes de las VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$

Con el propósito de caracterizar la expresión y procesamiento en un contexto celular de presentación de antígenos para las VLPs obtenidas a partir de la expresión de la proteína Z en un sistema eucariota *in vitro*, se procedió a generar el vector pZ-eGFP, que presenta la fusión de la proteína indicadora eGFP en el extremo 5'. Dichas partículas, denominadas VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$, se emplearon para inmunizar ratones BALB/c vía intramuscular. Los resultados obtenidos mostraron que las VLPs fueron capaces de inducir títulos de anticuerpos de tipo IgG contra eGFP significativamente mayores que los obtenidos inyectando la proteína eGFP como subunidad e incluso las VLPs tratadas con tritón X-100, un detergente que rompe su estructura (Borio et al., 2012). Estos datos indican, *a priori*, que para lograr una buena respuesta humoral no sólo es importante la composición de las VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$, sino también que se mantenga íntegra su estructura.

A continuación, se continuó explorando el funcionamiento del sistema de vehiculización utilizando antígenos virales como por ejemplo de rotavirus (Bergier, 2016; De Ganzó, 2017), del virus del sarampión (De Ganzó, 2017) y del virus del dengue (Mareze et al.,

2016). Sin embargo, en ninguno de esos casos se exploró la activación de los componentes celulares del sistema inmunológico como respuesta a las VLPs.

Respuestas celulares *in vitro* causadas por VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$

Luego de los resultados obtenidos que demostraban la existencia de una respuesta inmunológica humoral eficiente contra eGFP, nos propusimos analizar cómo afectaban las VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ a distintos componentes celulares del sistema inmune. En mi tesis de grado, fue posible caracterizar las respuestas *in vitro* de CPAs tras el estímulo de VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ (Pastorini, 2019). Pudo verse que las VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ son capaces de inducir un aumento en la expresión de las moléculas de MHC clase I y MHC clase II de CDs en ensayos *in vitro* utilizando células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones BALB/c. Además, las CDs presentaron un aumento de las moléculas co-estimulatorias CD40, CD80 y CD86, necesarias para la interacción con los linfocitos T (Pastorini, 2019).

Considerando que los resultados anteriores indicaron que las VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ son capaces de inducir maduración en CDs, y teniendo en cuenta el protocolo de purificación de las VLPs, se realizó el agregado de polimixina B para secuestrar el LPS presente, logrando descartar que los efectos observados se deban a la presencia de dicha sustancia. Finalmente, se comprobó la funcionalidad de las CDs maduras luego de ser incubadas con VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ ya que las mismas lograron inducir proliferación de linfocitos T alogeneicos en ensayos de MLR *in vitro*. Además, se pudo comprobar que las CDs maduras con VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ aumentan la secreción de las citoquinas IL-12, TNF-α e IL-10.

Al estudiar los macrófagos, se observó que las VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ inducen la secreción de cantidades significativas de citoquinas proinflamatorias tales como IL-12 y TNF-α en comparación con el control. También se detectó la presencia de IL-10 en el medio de cultivo de los macrófagos estimulados con VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$. Un resumen de los resultados obtenidos se muestra en la **Figura 18**.

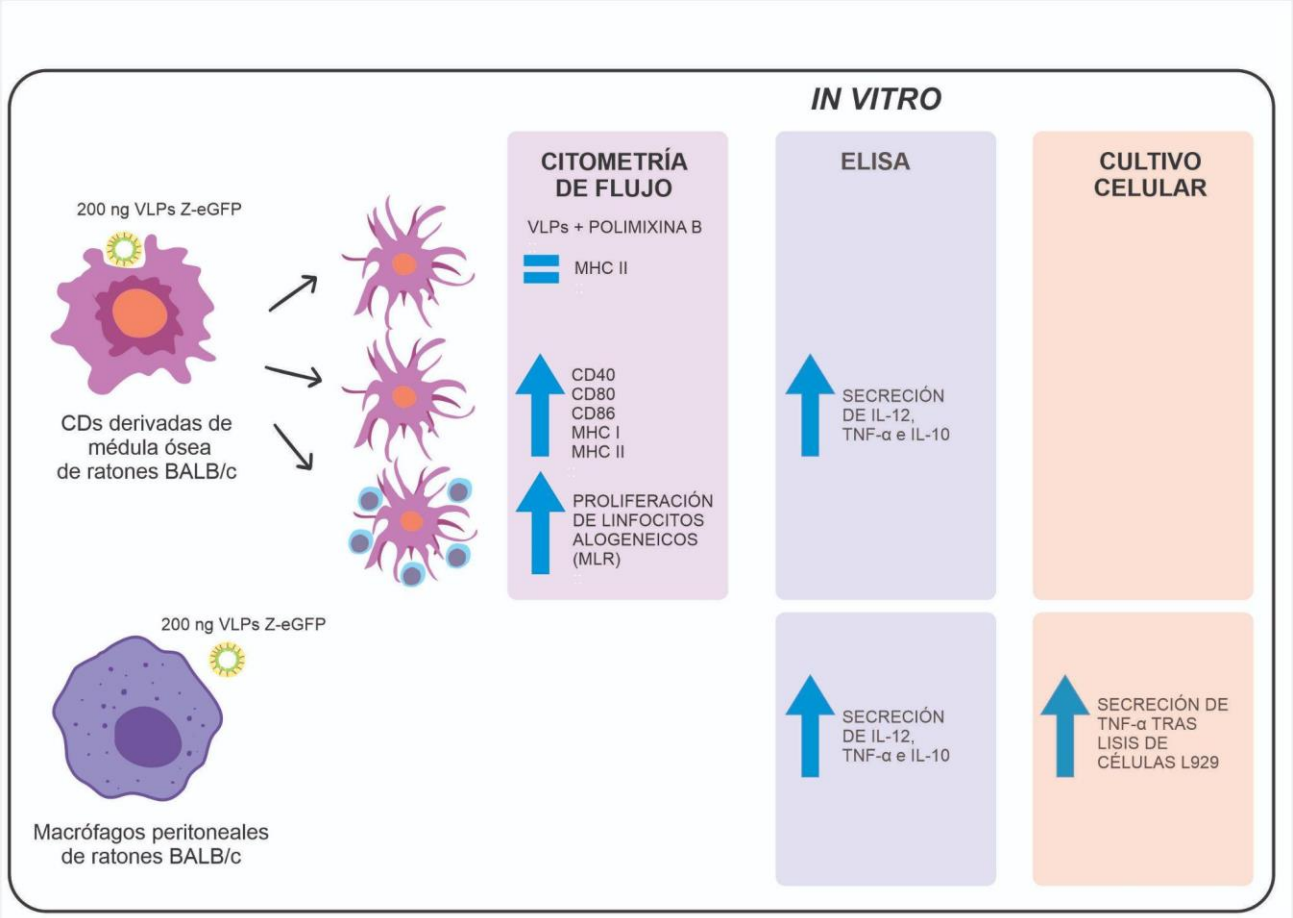


Figura 18. Caracterización de la respuesta celular *in vitro*. A partir de ratones BALB/c, se utilizaron células dendríticas y macrófagos peritoneales, y se incubaron por 24 o 48 hs con 200 ng de $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$. Todos los experimentos llevados a cabo se realizaron *in vitro* e implicaron el uso de técnicas de Citometría de Flujo utilizando anticuerpos acoplados a fluoróforos, kits de ELISA comerciales o cultivo celular (Pastorini, 2019).

Considerando los resultados previos, resulta de gran relevancia caracterizar la respuesta celular inducida por las $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ *in vivo*, con la finalidad de determinar el potencial de este sistema para la vehiculización de antígenos, ya sea para propósitos tanto preventivos como terapéuticos. En relación con el objetivo específico de la presente tesis para evaluar las VLPs derivadas de la proteína Z del virus Junín como plataforma para el *delivery* de antígenos utilizando un antígeno modelo, planteamos el diseño experimental que se muestra en la **Figura 19**.

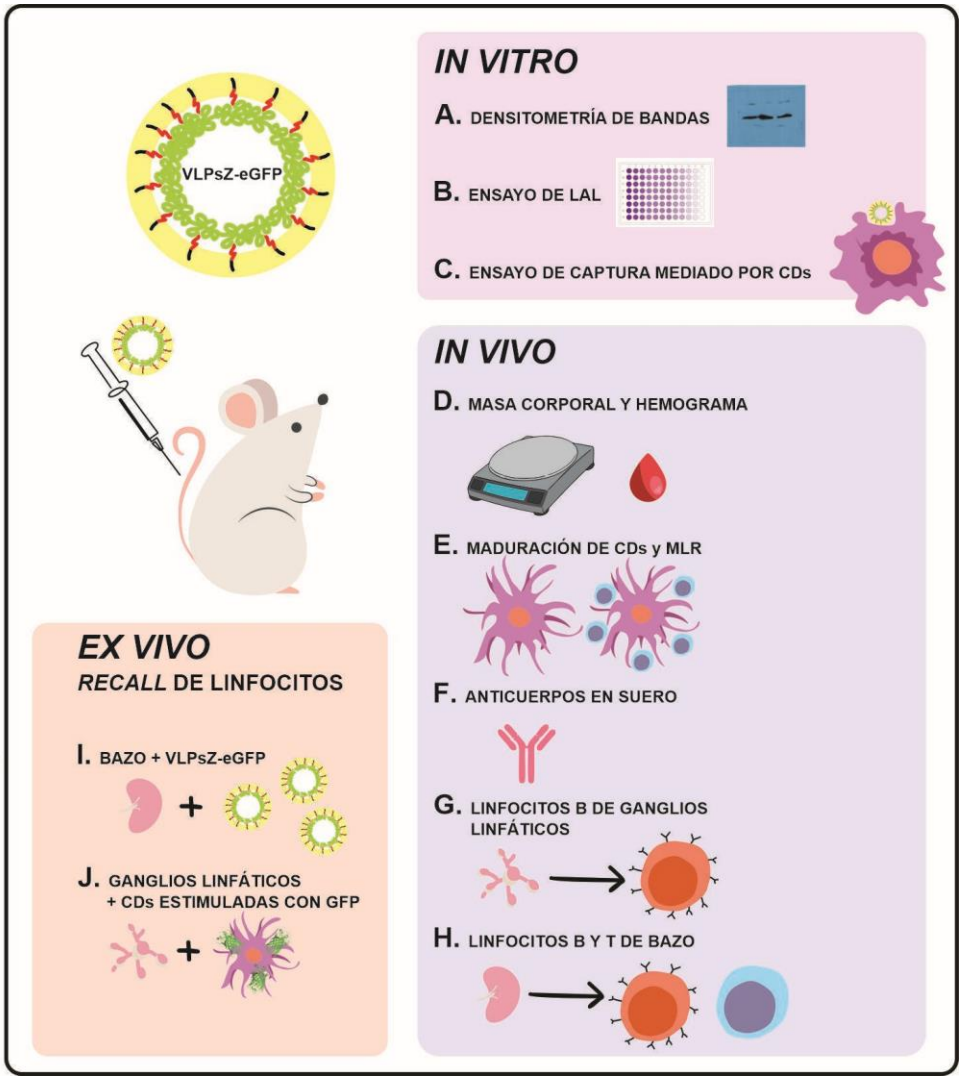


Figura 19. Resumen gráfico del diseño experimental. Se planificaron experimentos *in vitro* (derecha arriba), *in vivo* (derecha abajo) y *ex vivo* (izquierda). Los experimentos *in vitro* incluyeron: determinación de la proporción de carga de eGFP por ng de VLPs, determinación de endotoxina/LPS mediante un ensayo de LAL y análisis de la captura de VLPs por parte de CDs derivadas de médula ósea de ratones *naïve*. Los ensayos *in vivo* constaron de la inmunización de ratones con 5ug de VLPs o 100 µL de PBS y posteriormente: determinación de masa corporal de los ratones de todos los grupos, análisis hematológico de la sangre de los ratones a lo largo del experimento, determinación del estado madurativo de CDs y capacidad de inducir proliferación mediante ensayos de MLR, cuantificación de anticuerpos en suero mediante ELISA, caracterización de linfocitos B derivados de ganglios linfáticos y caracterización de linfocitos B y T derivados de bazo. Por último, se realizaron ensayos *ex vivo* mediante un *recall* de linfocitos, utilizando por un lado esplenocitos y por otro, linfocitos derivados de ganglios linfáticos.

Los materiales y métodos de este Capítulo se encuentran detallados en la Sección II, páginas 59 a 66.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción y control de calidad de las VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$

Como se indicó anteriormente, el sistema de producción de VLPs basado en la expresión de la proteína Z del virus Junín utilizando células HEK293T fue previamente desarrollado en el LVE (Borio et al., 2012; Pastorini, 2019). Para cada lote de VLPs se realizan controles de los pasos de la producción y purificación de las partículas tales como *Western Blotting* de las suspensiones utilizando tanto el anticuerpo Z como eGFP, SDS-PAGE para verificar la acción de la proteinasa K y microscopía de fluorescencia de las células transfectadas (datos no mostrados).

Hasta el momento de la escritura de esta tesis aún no se conoce la estructura cristalizada de la proteína Z de JUNV. Con la finalidad de elaborar hipótesis sobre la interacción entre los componentes del sistema de presentación de antígenos, se utilizaron herramientas bioinformáticas utilizando la estructura de una proteína homóloga como la proteína matriz del virus Lassa. Mediante el uso de dichas herramientas se predijo que las fusiones proteicas Z-antígeno se encuentran en la cara interna de la membrana plasmática y el agregado de una secuencia optimizada de 9 pares de bases entre dichas secuencias nucleotídicas permitirían un plegamiento adecuado de cada uno de los miembros (Borio et al., 2012; Pastorini, 2019).

Pese a ello, las predicciones basadas en modelos bioinformáticos suelen ser poco eficientes para determinar la proporción de carga de antígenos por cada VLP individual o en relación a las copias de la proteína Z de JUNV. Es por ello que se estimaron las copias de eGFP por µg de VLPs mediante densitometría de bandas utilizando placas radiográficas de *Western Blotting* (**Figura 20A**). Como se puede observar en la **Figura 20B** el análisis arrojó que 1 µg de VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ porta aproximadamente 0,474 µg de eGFP. Considerando las cantidades usualmente utilizadas en los ensayos realizados, se emplearon aproximadamente 94,8 ng de eGFP por cada 200 ng de VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ para los ensayos *in vitro* y 2,37 µg de eGFP cada 5 µg de VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ para los ensayos *in vivo.*

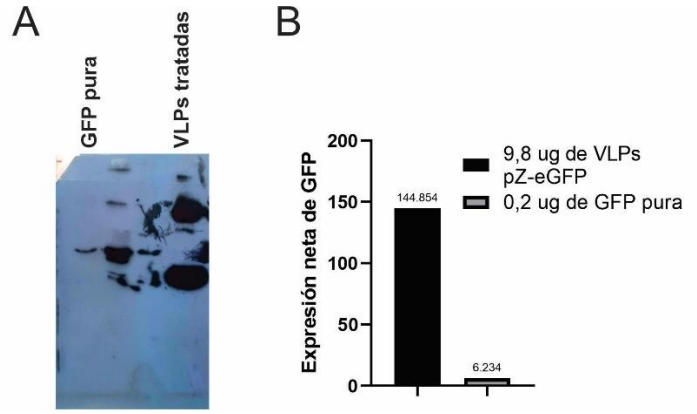


Figura 20. Carga de antígenos en VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$. A. *Western Blotting* utilizando el anticuerpo contra eGFP. B. Densitometría de bandas para la expresión de eGFP en VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ y GFP pura. Una cantidad total de 9,8 µg de VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ demuestran aproximadamente 23,2 veces más expresión de eGFP que 0,2 µg de GFP pura.

Como se mostró previamente en la **Figura 18**, se pudo comprobar que las VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ eran capaces de inducir la maduración de CDs y que ello no se debía a una contaminación con LPS. Con el paso de los lotes de producción de VLPs hemos puesto un especial énfasis en preservar la asepsia de las partículas, por lo que extremamos los cuidados al respecto. En ese sentido, se utilizaron reactivos de calidad apta para seres humanos tales como agua libre de pirógenos y solución fisiológica inyectable. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos era una tarea pendiente la determinación exacta de la posible contaminación de endotoxina en nuestros productos. Es por ello que llevamos a cabo la determinación de LPS y unidades de endotoxina mediante el uso de un kit comercial (**Figura 21)**, determinándose que las VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ poseen 0,126 ng de LPS/µg o 0,037 Unidades de endotoxina (UE)/µg. Al comparar con otras preparaciones de VLPs, las UE/µg son menores o similares en los lotes de las utilizadas en este capítulo (Benen et al., 2014; Pitoiset et al., 2017; Pushko et al., 2010).

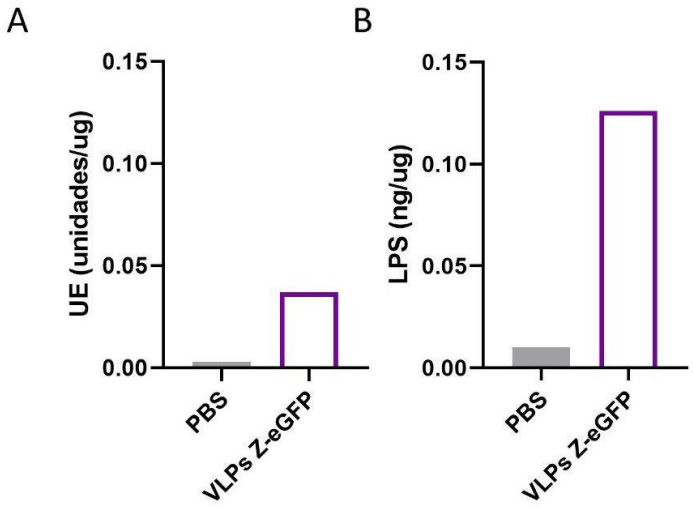


Figura 21. Niveles de endotoxina y LPS en suspensiones de las VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$. Una suspensión de 5 µg de VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ y PBS estéril fueron sometidos a una cuantificación de endotoxinas utilizando un ensayo de LAL. **A. Unidades de endotoxina por µg de VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$.** Los resultados indican que las VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ contienen 0,037 UE/µg. **B. Nanogramos de LPS por cada µg de VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$.** Los resultados muestran que las VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$. contienen 0,126 ng de LPS por cada µg. Los datos del PBS se muestran en color gris, mientras que los valores correspondientes las VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ se muestran en color violeta sin relleno.

Captura de VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ por CDs diferenciadas a partir de médula ósea murina

Dado que las CDs tienen un rol fundamental para el desarrollo de respuestas adaptativas, avanzamos en la caracterización del proceso de captura de las VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ por parte de dichas células mediante ensayos de inmunocitoquímica. Para ello se aislaron células de médula ósea de ratones BALB/c y se cultivaron en medio RPMI completo suplementado con GM-CSF e IL-4 durante 10 días para obtener CDs. Dichas células en su estado inmaduro se incubaron luego con VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ a diferentes tiempos (0, 10, 30 y 60 minutos) y luego las células fueron fijadas y marcadas con anticuerpos α-LAMP-1 y α-GFP. El anticuerpo contra GFP se utilizó con la intención de amplificar la señal de las VLPs, ya que la misma era débil. Para visualizar los resultados se utilizó un microscopio confocal y las imágenes capturadas se muestran debajo. Como se puede observar en la **Figura 22**, las CDs fueron capaces de capturar eficientemente las VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ en un periodo de tiempo entre 10 y 30 minutos. Además, se puede observar que el proceso de captura implica la vía endosomal, como se evidencia tras la co-localización de las VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ con la proteína LAMP-1 (*lysosomal-associated membrane protein 1*), un marcador de endosomas/lisosomas tardíos. La rapidez observada puede deberse a la naturaleza de las partículas ya que otros grupos de investigación han encontrado que diferentes VLPs ingresan a las CDs también en un periodo de 30 minutos (Da Silva et al., 2007; Sharma et al., 2012).

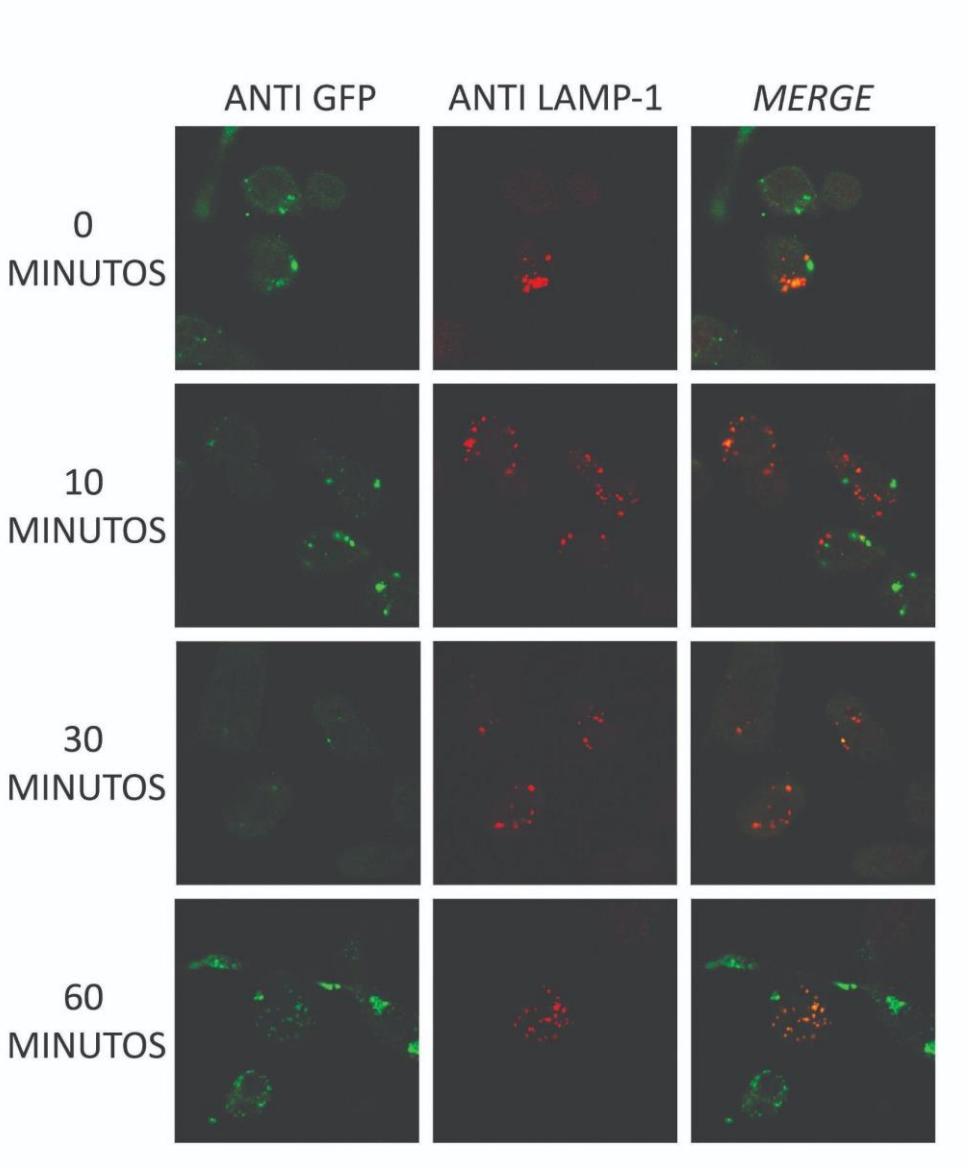


Figura 22. Detección confocal de la unión e internalización de VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$. Las CDs derivadas de médula ósea de ratones inmaduras fueron adheridas sobre portaobjetos de vidrio y luego de 2h, se adicionaron 500 ng de VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ durante distintos periodos de tiempo en hielo. Columna izquierda: Canal de fluorescencia para observar emisión de GFP; Columna central: Canal de fluorescencia para observar emisión de PE (LAMP-1); Columna derecha: fusión de las dos imágenes previas. Se muestran las tres colecciones de imágenes tras incubar a las CDs con las VLPs durante 0 minutos, 10 minutos, 30 minutos y 60 minutos (fila 1, 2, 3 y 4) respectivamente.

La transición de experimentos *in vitro* a modelos animales

Considerando los resultados obtenidos mediante experimentos *in vitro*, consideramos avanzar con la caracterización de la plataforma presentadora de antígenos en experimentos *in vivo*. En este sentido, se llevaron a cabo tres experimentos independientes con una cantidad

reducida de ratones basándose en los principios éticos de las 4R (reducción, reemplazo, refinamiento y responsabilidad) al considerar la experimentación con animales (Kang et al., 2022).

Una de nuestras prioridades en la ejecución de estos experimentos fue asegurar que las $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ no induzcan toxicidad o causen perjuicios para los ratones, por lo que prestamos atención especialmente en el bienestar animal. Para poder cuantificar eso, llevamos a cabo diversos controles como evaluación de la masa corporal de los animales de todos los grupos al final de los esquemas de inmunización y análisis hematológicos al comienzo, durante y al final de los experimentos. Además, hemos preservado muestras de suero para realizar análisis toxicológicos, especialmente para verificar que no haya daño hepático o renal asociados con la inmunización, pero no pudimos llevar a cabo dichos exámenes por cuestiones presupuestarias.

Comenzando con los análisis *in vivo* que se muestran en la **Figura 23**, se evaluó la presencia de variaciones de la masa corporal de los ratones y los valores hematológicos. En primer lugar, pudimos observar que no había diferencias significativas en la masa corporal de los ratones de los dos grupos de inmunización al finalizar los experimentos (**Figura 23A**). En general para evaluar a grandes rasgos la toxicidad de las formulaciones vacunales en modelos animales se suele analizar el peso de los ratones inyectados como una medida de seguridad de los componentes (Momose et al., 2010). Sin embargo, en este caso se realizó sin seguir un protocolo particular como la medición en días específicos post-inmunización, sino que la idea era obtener indicios que señalen que los animales inyectados no reducían su peso o lo aumentaban significativamente en comparación con el grupo control. Esta evidencia no es suficiente para asegurarlo, pero la hemos considerado una herramienta más para la caracterización.

Si bien no se llevaron a cabo ensayos de desafío porque la construcción utilizada no permite esta opción, los ratones fueron monitoreados todos los días para verificar su bienestar, tanto por integrantes del equipo de investigación como por personal del bioterio del IMEX. Los animales inmunizados se mostraron sin signos de sufrimiento ni decaídos hasta el último día del experimento. Para ello se consideraron las tablas de *score* como por ejemplo la escala Grimace para ratones que considera diversas expresiones faciales de los ratones que implican dolor como el fruncido de las órbitas de los ojos, la posición de las orejas y el estado de los bigotes, entre otros (Langford et al., 2010).

Sumado a esto, encontramos que los ratones de ambos grupos demostraron valores normales en su composición hematológica al final de los experimentos (**Figura 23B**). Debajo se pueden observar sólo cinco parámetros, ya que poseen una gran propiedad informativa, permitiendo realizar un análisis general del estado del animal.

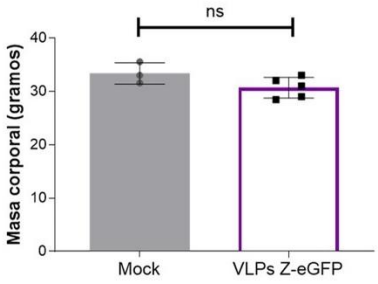
El parámetro WBC indica el recuento de glóbulos blancos en sangre, y típicamente en

ratones debería ser de 2.000 a 10.000 por microlitro (O'Connell et al., 2015). Considerando dichos valores, ambos grupos de ratones poseen concentraciones fisiológicas. Por otro lado, el parámetro HCT (hematocrito) es una medida del volumen de los glóbulos rojos y en ratones sanos debería encontrarse entre 35% y 52%, siendo generalmente 3 veces mayor a la concentración de HGB (O'Connell et al., 2015). Como se puede observar en la **Figura 23**, tanto el grupo de los ratones inmunizados con $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ como el grupo control poseen los valores de HCT dentro del rango normal e incluso una proporción aproximada de 3 veces el HGB.

Otro parámetro interesante para analizar es el porcentaje de granulocitos, que debe encontrarse entre 8% y 48%, y que se halló que está dentro del rango normal en ambos grupos de ratones. Los granulocitos son los neutrófilos, eosinófilos y basófilos, células del sistema inmune innato que participan en distintos procesos inmunológicos. Cuando se observa un aumento en los granulocitos es un indicativo de infecciones o afecciones de la médula ósea. Al contrario, cuando se observa una disminución, esto implica que el organismo se encuentra más susceptible a infecciones por la baja cantidad de células que podrían responder ante el eventual ingreso de un patógeno.

Por último, se puede observar que el porcentaje de linfocitos también se encuentra en el rango de los valores normales en ambos grupos de ratones. Este dato también es interesante ya que nos permite determinar que la inmunización con las $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ no afecta significativamente a las poblaciones linfocitarias, al menos al observar un panorama general.

A



B

	Mock	VLPs Z-eGFP	Valores normales
WBC (10^3/uL)	5,38 ± 2,14	4,47 ± 1,83	**(2-10)**
HCT	40,32 ± 2,70	39,66 ± 0,99	**(35-52)**
HGB	2,99 veces HCT	2,92 veces HCT	**3 veces HCT**
GR%	6,52 ± 9,28	9,89 ± 5,74	**(8-48)**
LY%	87,72 ± 10,23	87,76 ± 5,01	**(57-93)**

Figura 23. Estado fisiológico de los ratones inmunizados. A. Masa corporal de los ratones al final del experimento. Se muestran los valores promedio en gramos de las mediciones de masa corporal de los ratones al finalizar el protocolo de inmunización y el respectivo desvío estándar. No se han encontrado diferencias estadísticas entre los dos grupos de inmunización. Los datos del grupo control o *Mock* se muestran en color gris, mientras que los valores correspondientes al grupo de ratones inyectados con $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ se muestran en color violeta sin relleno. **B. Valores hematológicos de los ratones de ambos grupos.** Se muestra la tabla resumen con los valores promedio y desvío estándar para cada uno de los parámetros y considerando los grupos de ratones. A la derecha se detallan los valores normales para cada uno de los parámetros. Los valores mostrados corresponden con los análisis de las muestras el día final de los experimentos.

Luego de tener evidencias que indican que *a priori* las VLPs no son tóxicas para los ratones, nos enfocamos en otros experimentos para evaluar la respuesta celular asociada a la inmunización de dichas VLPs en los modelos utilizados.

En trabajos previos de integrantes de nuestro laboratorio hemos demostrado que las $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ son capaces de inducir maduración en CDs derivadas de médula ósea de ratones, luego de 24 horas de incubación con las mismas *in vitro*. Además, se pudo comprobar que dichas CDs eran funcionales al lograr inducir la proliferación de linfocitos alogeneicos en ensayos de MLR, también *in vitro* (Pastorini, 2019). Naturalmente las CDs luego de activarse, migran a los órganos linfoides para secretar citoquinas inflamatorias que como consecuencia colabora al montaje de una respuesta adaptativa específica contra el antígeno.

Habiendo demostrado la habilidad de las $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ para activar CDs *in vitro*, se procedió a evaluar la activación de CDs *in vivo*. Para ello se inyectaron 3 ratones BALB/c vía intraperitoneal con $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ o solución fisiológica y luego de 25 horas se evaluó el estado de maduración de las CDs en los ganglios inguinales y mesentéricos. Se acotó el análisis para la población celular CD11c+, evaluando la expresión de las moléculas MHCII y CD86 mediante citometría de flujo. Al inmunizar ratones con $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ se puede observar una tendencia al aumento de la expresión de MHCII y CD86 en comparación con el grupo control (**Figura 24A**).

Cuando se refiere a CDs en su estado maduro implica que las mismas poseen el perfil fenotípico de expresión de altos niveles de MHC, moléculas de adhesión y co-estimulatorias. Sin embargo, para verificar que efectivamente dichas células tienen una funcionalidad se avanzó en la realización de un ensayo de MLR, con la finalidad de comprobar que las CDs son capaces de inducir proliferación a linfocitos alogeneicos. Para eso se utilizaron esplenocitos de ratones C57BL/6 *naïve* como células respondedoras, purificadas mediante gradiente de densidad de Ficoll. Se observó un aumento significativo en el MLR de los ratones inmunizados en comparación con el grupo control, indicativo de un mayor estado de maduración de las CDs (**Figura 24B**). Como puede observarse en la región izquierda de la **Figura 24B**, hay una población que posee un gran corrimiento a la izquierda de la señal de CFSE, implicando que hay un grupo de células en proliferación activa. En este sentido, dichos resultados confirman que las CDs se encuentran funcionales en términos de inducir proliferación de linfocitos.

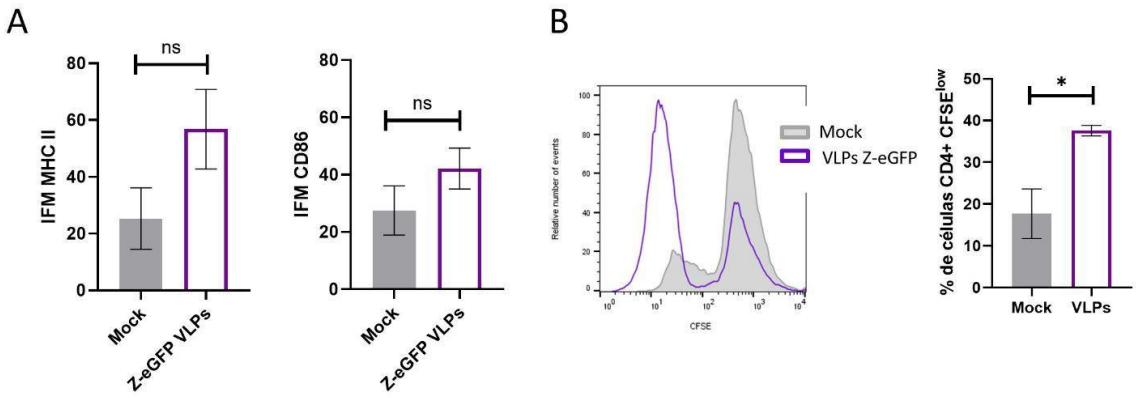


Figura 24. Estado madurativo y funcional CDs *in vivo* en ratones inyectados con VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$. A. Expresión de MHC clase II y CD86 en CDs de ratones de ambos grupos. Las suspensiones celulares derivadas de ganglios linfáticos fueron tratadas con anticuerpos marcados con fluoróforos y se evaluaron las señales de fluorescencia de CD86 y MHCII de las células CD11c$^+$ mediante citometría de flujo. Izq: Se muestra la intensidad de fluorescencia media (IFM) y desvío estándar de la expresión de MHC clase II en la población celular CD11c+. Der. Se muestra la IFM y desvío estándar de la expresión de CD86 en la población celular CD11c+. **B. Proliferación de linfocitos durante ensayos de MLR.** Dichos experimentos fueron realizados incubando esplenocitos de ratones C57BL/6 marcados con CFSE junto con células de ganglios linfáticos de ratones BALB/c. Izq: Histograma superpuesto representativo de la fluorescencia en el canal FL1 correspondiente a la señal de CFSE. Der: Porcentajes de células con señal de CFSE baja en células CD4+. Se muestra la media y el desvío estándar para cada grupo de ratones, así como la significancia estadística. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*p< 0.05 vs Control; **p<0.01 vs Control; ***p<0.001 vs Control; ns=no significativo). Los datos del grupo control o *Mock* se muestran en color gris, mientras que los valores correspondientes al grupo de ratones inyectados con VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ se muestran en color violeta sin relleno.

Análisis de los linfocitos B tras la inmunización con VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$

Como se ha abordado varias veces en esta tesis, la inmunización de ratones BALB/c con VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ generó la producción de títulos de anticuerpos IgG anti-GFP significativamente mayores que el resto de los grupos de ratones (Borio et al., 2012). A pesar que los procedimientos de purificación de VLPs se realizaron replicando los utilizados en dicho trabajo, al cambiar la ruta de administración decidimos evaluar la producción de anticuerpos en nuestro modelo. Mientras que el esquema de inmunización utilizado en dicho trabajo implicó dos dosis de 5 µg de VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ en los días 0 y 21, en la presente tesis también se utilizaron dos dosis de 5 µg de VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$, aplicadas en los días 0 y 15. Para ello se utilizaron sueros de ratones inyectados con VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ y del grupo control, cuantificando los anticuerpos IgG específicos anti-eGFP, resultados que se muestran en la **Figura 25A**. Como se puede observar, los resultados no son tan robustos como los observados en el trabajo de Borio y colaboradores, pero esto puede deberse a varios factores: en principio la utilización de técnicas más asépticas para la purificación de las partículas podría

reducir las respuestas inmunológicas ya que los contaminantes podrían servir como adyuvantes accidentales. Por otro lado, la ruta de inmunización puede tener implicancias en los tipos de respuestas inmunológicas asociadas, dado que por ejemplo las inmunizaciones intraperitoneales suelen fomentar el desarrollo de inmunidad en mucosas y la producción de anticuerpos en el compartimento peritoneal (Kocabiyik et al., 2024).

Además, en línea con los objetivos de nuestro proyecto, nos propusimos la caracterización de la respuesta celular de linfocitos B contra las $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$. Con ese fin, analizamos la frecuencia y estado de activación de linfocitos B en bazos y ganglios linfáticos tanto de los ratones inmunizados como de los ratones del grupo control. El esquema de inmunización y un resumen de todos los análisis realizados se muestran en la **Figura 14**.

Para poder obtener información más clara al respecto, analizamos por separado los bazos de los ganglios linfáticos. Con respecto a los bazos, como se puede apreciar en la **Figura 25B**, aparece una población distintiva en los animales inmunizados con $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ al observar los perfiles de FSC/CD19, ausente en el grupo control. Más aún, cuando se evaluó la expresión de los marcadores B220 y CD19 en bazo se encontró que los ratones inmunizados con $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ mostraron un aumento en la población celular $CD19^{+}$, en comparación con el grupo control (**Figura 25C**). Durante el desarrollo de respuestas de linfocitos B, se originan distintas poblaciones celulares y cambian sus perfiles fenotípicos, especialmente en órganos linfoides secundarios, un hecho que ha sido reportado previamente en bazo por ejemplo (Baumjohann et al., 2013). CD19 es un marcador específico para el linaje de linfocitos B, se considera un co-receptor del receptor de células B (BCR) y es capaz de reducir el umbral de activación de dicha estirpe celular.

Por otro lado, se analizaron los ganglios linfáticos (mesentéricos e inguinales), observando una disminución de la expresión de B220 en los ratones del grupo de inmunizados con $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ (**Figura 25D**). Este hecho puede sugerir la presencia de una población de blastos de células plasmáticas en proliferación activa, como ha sido previamente reportado que ocurre durante infecciones virales en individuos vacunados (Ardavín et al., 1999).

A pesar que en este capítulo no se investigaron las respuestas de memoria en gran profundidad, las células derivadas de los ganglios linfáticos demostraron una disminución significativa de la expresión del marcador B220, el cual puede servir como un indicador temprano de plasmablastos en división y la formación de células plasmáticas. Las células plasmáticas son linfocitos B especializados en la secreción de anticuerpos, cuyo origen ocurre en los centros germinales de los ganglios linfáticos donde linfocitos T *helpers* juegan un rol crítico y ocurren varios procesos, incluyendo el cambio de clase de anticuerpos y la hipermutación de los segmentos génicos variables. Se ha reportado anteriormente que las células B220- contribuyen a

la producción de anticuerpos como consecuencia luego de la inmunización con otras formulaciones vacunales (Driver et al., 2001).

Sumado a esto, la intensidad media de fluorescencia de CD19 se observó significativamente reducida en las células derivadas de ganglios linfáticos en el grupo de ratones inmunizados con $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ al comparar con el grupo control (**Figura 25D**). Esta última observación podría deberse a la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas dado que las últimas no expresan CD19.

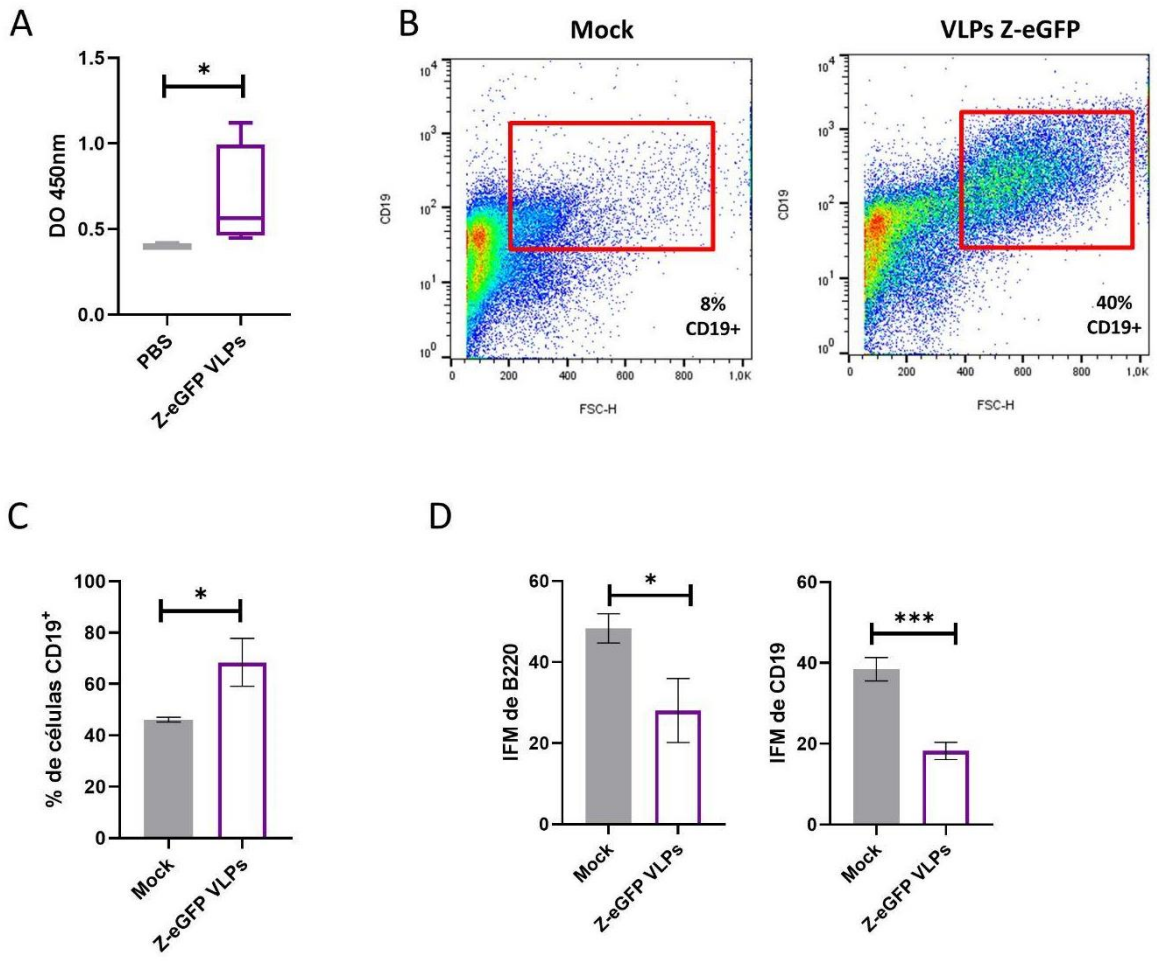


Figura 25. Respuestas relacionadas con linfocitos B en ratones tras la inmunización con $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$. A. Cuantificación de anticuerpos IgG contra GFP en sueros de ratones de ambos grupos. Se muestran las densidades ópticas a 450 nm tras la realización de ensayos de ELISA indirecto. **B. Perfiles de tamaño y granularidad de los esplenocitos de los distintos grupos.** Se muestran *dot plots* representativos considerando la expresión CD19/FSC-H y CD19/B220. Izq: ratón inyectado con solución fisiológica. Der: ratón inmunizado con $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$. **C. Población de células CD19 positivas en bazo.** Se consideraron los porcentajes de células correspondientes a la población CD19+. Se muestran las medias y el desvío estándar de cada una. **D. Expresión de B220 y CD19 en poblaciones celulares de ganglios linfáticos.** Izq: Expresión diferencial de B220 en ratones de los diversos grupos de inmunización. Se

muestra la intensidad de fluorescencia media, expresada como media±desvío estándar. Der: Expresión de CD19 en muestras de ratones de distintos grupos de inmunización. Se muestra la Intensidad Media de Fluorescencia de CD19 expresada como media ± desvío estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*p< 0.05 vs Control; **p<0.01 vs Control; *** p<0.001 vs Control). Los datos del grupo control o *Mock* se muestran en color gris, mientras que los valores correspondientes al grupo de ratones inyectados con $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ se muestran en color violeta sin relleno.

Análisis de la activación de linfocitos T tras la inmunización con $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$

Habiendo evaluado el estado de las CPA y continuando con el montaje de una respuesta inmunológica adaptativa, avanzamos en la evaluación de los linfocitos que interactúan con dichas células. La activación de CDs causada por $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ que se observó puede mejorar directamente la capacidad de presentar antígenos por parte de dichas células y consecuentemente la activación de linfocitos específicos. Con la intención de determinar la eficacia de la inmunización con $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$, 3 semanas luego del último refuerzo se examinaron los marcadores de activación de linfocitos en los órganos linfoides secundarios, incluyendo el bazo, los ganglios inguinales y mesentéricos de los grupos de ratones BALB/c inyectados con $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ y grupo control inyectados con solución fisiológica. El esquema de inmunización es el mismo que para los ensayos anteriores y se muestra en la **Figura 14**.

Al analizar las muestras mediante citometría de flujo se observan perfiles de tamaño y granularidad (FSC/SSC) diferenciales entre ambos grupos de ratones (**Figura 26A**). Como se puede observar en dicha figura, los linfocitos provenientes de ratones inmunizados muestran la aparición de una nueva población celular en la región derecha, sugiriendo una proliferación activa de dichas células. Por otro lado, se observó un aumento significativo de la expresión de CD69 en linfocitos T $CD4^+$ en ratones inyectados con las $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ en comparación con el grupo control, como se muestra en la **Figura 26B**. Dado que CD69 se considera un marcador temprano de activación debido a que aparece rápidamente en la superficie de la membrana plasmática de los linfocitos luego de la estimulación, podría significar una mayor activación de los linfocitos.

Durante el diseño de los experimentos nos hemos propuesto evaluar la respuesta de memoria, y en linfocitos T eso se puede lograrse mediante la expresión de CD44 y CD62L en superficie celular. Lamentablemente por problemas presupuestarios sólo tuvimos acceso a anticuerpos CD62L, por lo que la caracterización realizada fue parcial. Como se observa en la **Figura 26C,** las $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ indujeron un aumento significativo en la expresión de CD62L tanto en las poblaciones de linfocitos CD4+ como CD8+ tanto en bazo como en ganglios en comparación con el grupo control. La molécula CD62L o L-selectina tiene un rol en la adhesión celular y se encuentra en la superficie celular de leucocitos permitiendo el ingreso a órganos linfoides y como consecuencia, es un marcador para células de memoria central. Las células CD62L residen en la zona de células T de órganos linfoides y pueden responder rápidamente a la re-estimulación

antigénica mediante proliferación y diferenciación a células efectoras. Los resultados obtenidos podrían indicar que las VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ son capaces de inducir mecanismos de memoria central celular.

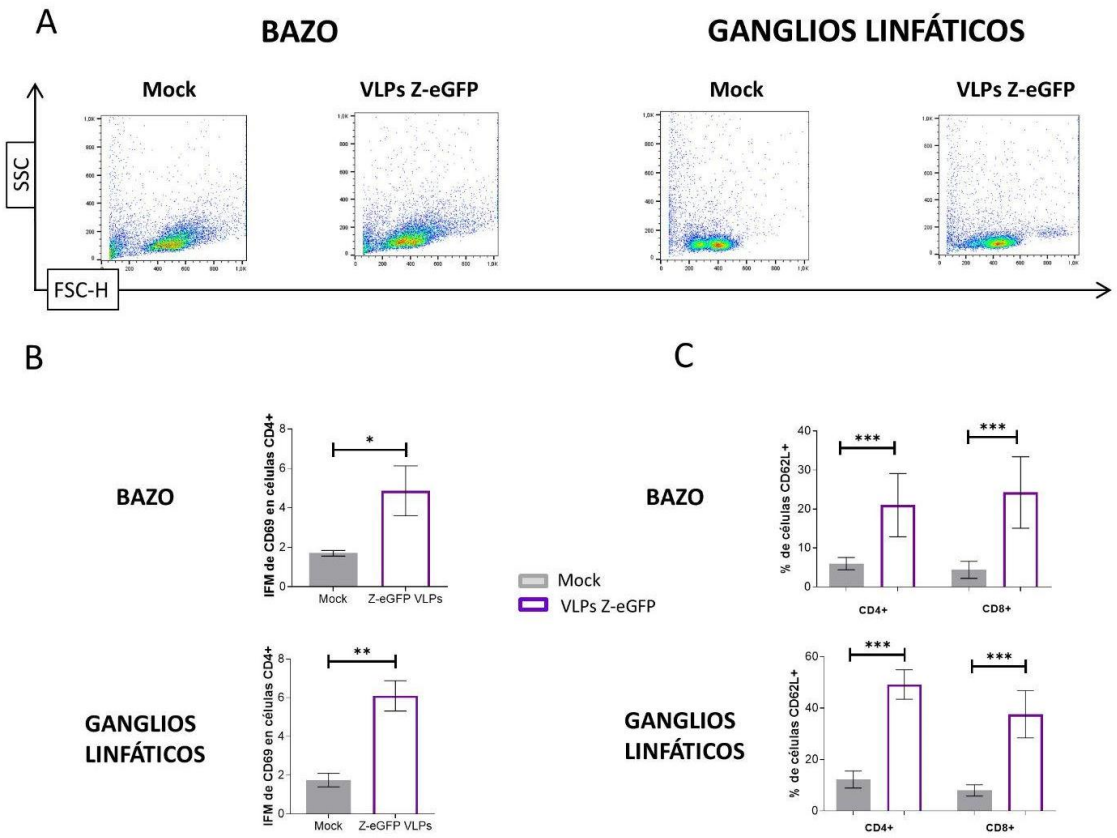


Figura 26. Caracterización de las poblaciones de linfocitos T en órganos linfoides de los grupos de ratones inyectados. A. Perfiles representativos de tamaño y granularidad de las células obtenidas de los dos grupos de ratones. Se muestran perfiles representativos de las señales FSC-H y SSC-H para dos ratones. Izq: Perfiles de dos bazos de ratones de distintos grupos (grupo control a la izquierda e inyectados con VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ a la derecha. **B. Expresión de CD69 en células CD4$^+$**. Se muestra la IFM para el marcador CD69 en células CD4+. Arriba: células derivadas de bazo. Abajo: células derivadas de ganglios linfáticos. **C. Expresión de CD62L en poblaciones CD4$^+$ y CD8$^+$**. Luego de 5 días de estimulación *ex vivo*, las células se marcaron con anticuerpos anti CD4, CD8 y CD62L y la expresión se analizó mediante citometría de flujo. Arriba: porcentaje de células CD62L positivas en bazo (CD4+ a la izquierda y CD8+ a la derecha). Abajo: porcentaje de células CD62L positivas en ganglios linfáticos (CD4+ a la izquierda y CD8+ a la derecha). Todos los datos se representan como la media ± el desvío estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*p< 0.05 vs Control; **p<0.01 vs Control; *** p<0.001 vs Control). Los datos del grupo control o *Mock* se muestran en color gris, mientras que los valores correspondientes al grupo de ratones inyectados con VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ se muestran en color violeta sin relleno.

Análisis de las funciones efectoras de linfocitos T tras inmunización con VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$

La intensidad de las respuestas celulares mediadas por linfocitos T juega un rol fundamental en la generación de tanto la inmunidad humoral como celular. Considerando que no existe la posibilidad de hacer un desafío con algún agente patológico para evaluar la eficacia de las VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$, propusimos la realización de un protocolo de *recall* de linfocitos. El objetivo principal de este ensayo es analizar la capacidad de los linfocitos provenientes de animales inmunizados para reconocer antígenos específicos de los componentes de la formulación vacunal en un contexto *ex vivo.*

Para ello, 3 semanas luego del último refuerzo se llevó a cabo un ensayo de proliferación de linfocitos isogeneicos utilizando como estímulos GFP pura, VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ o PBS. Como la proliferación requiere la presencia de CPA, antes del agregado de los linfocitos se colocaron CDs derivadas de médula ósea de ratones BALB/c que fueron maduradas 24 horas antes de la incubación con los linfocitos con distintos estímulos. De esta forma, esperamos simular un contexto de infección, en el cual los linfocitos puedan responder si una CPA se encuentra presentando los antígenos vehiculizados en la plataforma (antígenos blanco del patógeno) y actuar en consecuencia. La diferencia con el MLR es que en este caso no es nuestro deseo evaluar el estado madurativo de las CDs, por lo que la cepa de los ratones a partir de los cuales se generan las suspensiones celulares a utilizar debe ser la misma. El esquema de inmunización fue idéntico al utilizado para los experimentos anteriores (**Figura 14**) y los linfocitos provenientes de los ratones inmunizados fueron mantenidos en cultivo durante 5 días junto con las CDs estimuladas previamente.

El resultado esperado para indicar que la inmunización indujo una respuesta de memoria y por lo tanto fue exitosa, sería que los linfocitos derivados de ratones inyectados con las VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ proliferen ante la presencia de GFP pura. Esto es, porque justamente esta plataforma se propone como presentadora de antígenos heterólogos y por más inmunogénica que sea, el objetivo es que la respuesta obtenida sea específica. Consistente con los resultados previos sobre la producción de anticuerpos tras la inmunización en ratones BALB/c, los ratones inmunizados únicamente con GFP no montaron una respuesta inmunológica celular diferente a la del grupo control (**Figura 27**). Al contrario, la inmunización con VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ indujo significativamente la proliferación de los linfocitos T en respuesta a las VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ ($p<0.001$ vs Control) y a la proteína GFP pura ($p<0.001$ vs Control) luego de la re-estimulación *ex vivo* (**Figura 27**). Este hecho sugiere que las VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ pueden ser útiles como una plataforma adecuada para proveer inmunogenicidad a una proteína o antígeno que no la tiene por sí misma, como se reportó anteriormente (Borio et al., 2012).

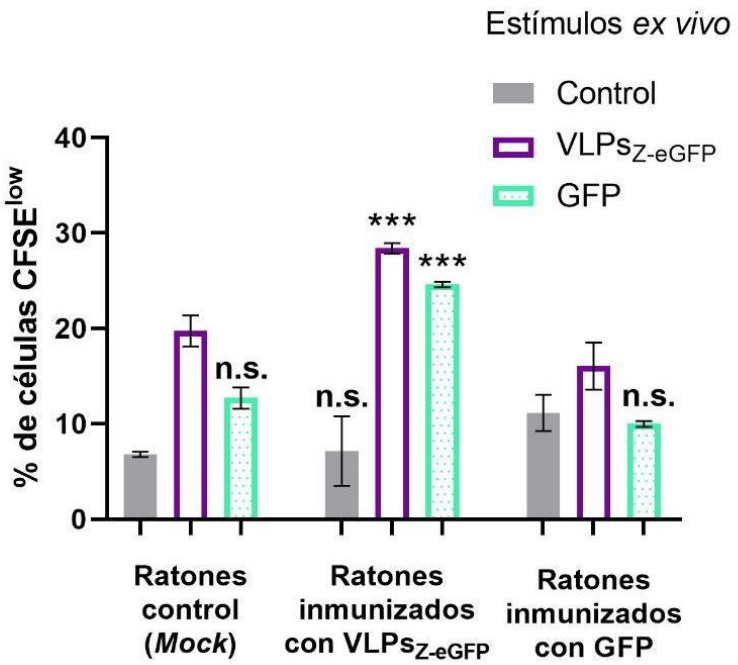


Figura 27. Respuestas de linfocitos T tras la inmunización de ratones con VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ y estimulación *ex vivo*. Las suspensiones celulares derivadas de ganglios linfáticos de los ratones inmunizados fueron marcadas con CFSE y estimuladas con 0.2 µg de PBS, VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ o GFP durante 5 días. Se muestran los porcentajes de células de la población con baja señal de CFSE en los distintos grupos. En gris se muestran las células estimuladas *ex vivo* con PBS; en violeta se muestran las células estimuladas *ex vivo* con VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$; en verde relleno con pintitas se muestran las células estimuladas *ex vivo* con GFP pura. Los datos se representan como la media ± desvío estándar (n = 6). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*p< 0.05 vs Control; **p<0.01 vs Control; *** p<0.001 vs Control).

En los resultados previos a esta tesis se observó que las VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ indujeron la secreción de citoquinas típicamente proinflamatorias como IL-12 y TNF-α, que son clásicamente parte de una respuesta de tipo 1. En ese sentido, para evaluar las funciones efectoras de los linfocitos decidimos evaluar la producción de IFN-ɣ por parte de esplenocitos en los ratones de ambos grupos de inmunización. Al finalizar el esquema de inmunización, se obtuvieron los ganglios linfáticos y los bazos de los ratones y las células fueron re-estimuladas con VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ o PBS durante 72 horas. La secreción de IFN-ɣ fue evaluada tanto por ELISA como por citometría de flujo. Como se muestra en la **Figura 28A,** los esplenocitos del grupo inmunizado mostraron significativamente mayores cantidades secretadas de IFN-ɣ, únicamente en la presencia de VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ en la re-estimulación ($p<0.01$). En este sentido, solo los esplenocitos de los ratones inmunizados con VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ fueron capaces de secretar cantidades significativas de IFN-ɣ, ya que los ratones inmunizados en ausencia del estímulo no lo hicieron. Las células derivadas de ratones del grupo control no demostraron producción de IFN-ɣ incluso en presencia de las VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$.

Además, la caracterización fenotípica de las células secretoras de IFN-ɣ mediante

citometría de flujo mostró que tanto los linfocitos $CD4^+$ como $CD8^+$ están involucrados en dicho proceso (**Figura 28B**). Uniendo todos los resultados obtenidos, los datos sugieren que las $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ son capaces de inducir una respuesta funcional CD4 y CD8 contra el antígeno vehiculizado, siendo eGFP en este caso.

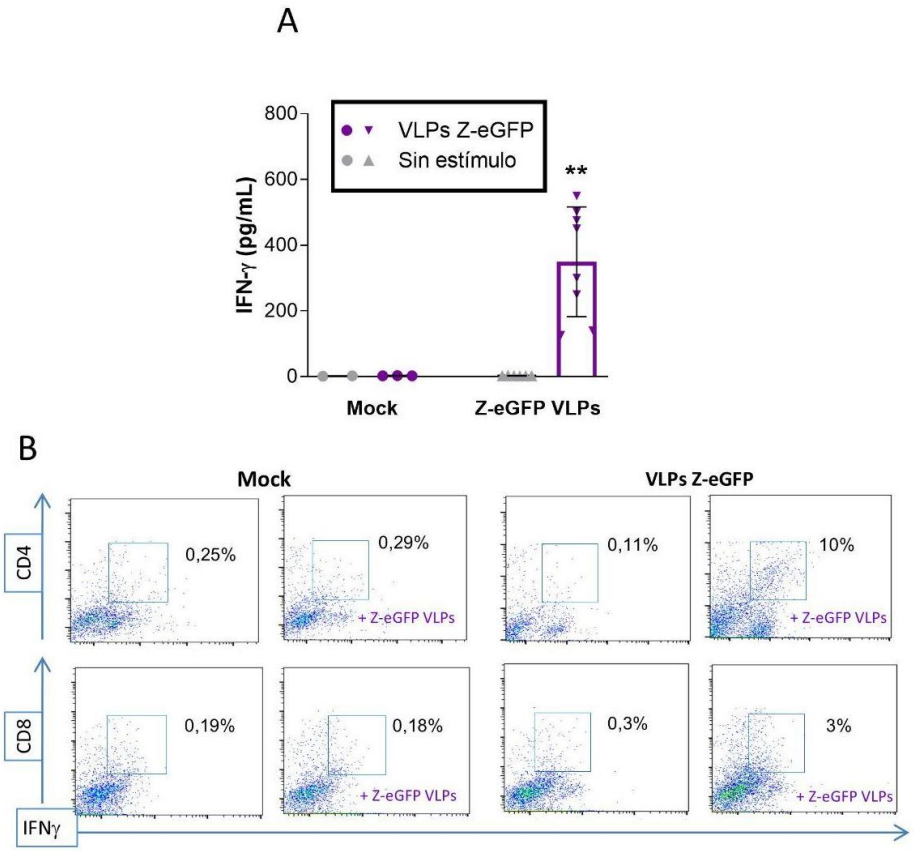


Figura 28. Producción y secreción de IFN-ɣ en bazos de ratones inmunizados con $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$. A. Cuantificación del IFN-ɣ secretado por los esplenocitos re-estimulados *ex vivo*. Los esplenocitos obtenidos de ratones de ambos grupos fueron cultivados en presencia de 0.2 µg de $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ durante 3 días y se recolectaron los sobrenadantes de cultivo a partir de los cuales se realizó una cuantificación de IFN-ɣ utilizando un ELISA disponible comercialmente. Cada muestra fue medida por triplicado y los datos se representan como media ± desvío estándar (n = 6). **B. Producción representativa de IFN-ɣ por esplenocitos estimulados *ex vivo***. Las suspensiones celulares fueron obtenidas a partir de los bazos de los ratones de ambos grupos y cultivadas con 0.2 µg de $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ durante 17 horas. Luego, las células fueron tratadas con brefeldina A, fijadas y marcadas con anticuerpos contra CD4 y CD8. Luego se llevó a cabo la marcación intracelular con un anticuerpo monoclonal contra IFN-ɣ y se analizaron los resultados mediante citometría de flujo. Los datos se representan como la media ± desvío estándar (n = 6). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*p< 0.05 vs Control; **p<0.01 vs Control; *** p<0.001 vs Control).

CONCLUSIONES

En este capítulo se describe la respuesta inmune celular inducida por las $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ en un modelo de ratón, estudiando diversos distintos componentes del sistema. Un resumen de los resultados se puede observar en la **Figura 29**.

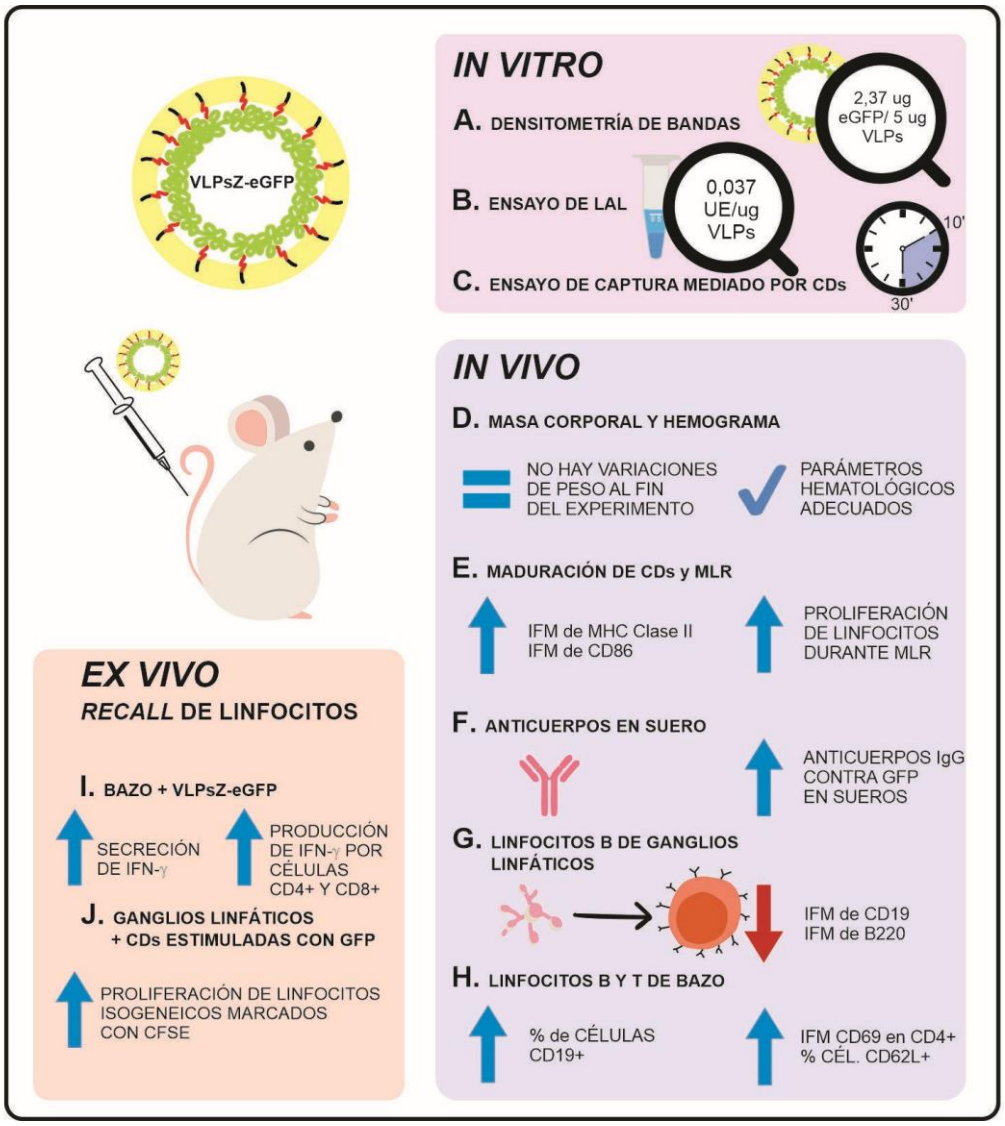


Figura 29. Resumen gráfico de los resultados de este capítulo. A la derecha arriba se muestran los hallazgos *in vitro*, a la izquierda se muestran los resultados *ex vivo* y a la derecha abajo se detallan los descubrimientos *in vivo.*

En los resultados que anteceden a esta tesis, se encontró que las $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ tienen la habilidad de inducir la maduración de CDs *in vitro*, evidenciado al medir la expresión aumentada de moléculas co-estimulatorias, MHCI y MHCII (Pastorini, 2019). Es importante tener en consideración que este fenómeno fue observado tanto con CDs de ratones BALB/c como

C57BL/6, en un intento para analizar los efectos de dichas VLPs de acuerdo con distintos *backgrounds* genéticos (datos no mostrados).

Mediante la realización de ensayos *in vivo* en ratones BALB/c se observaron efectos congruentes con los resultados *in vitro*. Las CDs en ratones inyectados con $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ mostraron un aumento en la expresión de CD86 y MHC II, y además las mismas son funcionales, logrando inducir la proliferación de linfocitos alogeneicos durante los ensayos de MLR. Además, se encontró que las $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ se unen eficientemente y son rápidamente internalizadas por las CDs, considerando un periodo entre 10 y 30 minutos en experimentos *in vitro*.

También se observó que una gran cantidad de células muestran marcadores de activación tanto en el bazo como en ganglios linfáticos regionales, tales como linfocitos T CD4+, CD8+ y linfocitos B CD19+. Este hecho indicaría que las $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ estimulan eficientemente tanto las respuestas humorales como celulares.

La prueba de concepto utilizada para demostrar la utilidad de las $VLPs_{Z}$ fue exitosa, ya que se observó un aumento significativo de la proliferación de linfocitos T derivados de ratones inmunizados al encontrarse con la proteína GFP pura en un contexto *ex vivo*. Se encontró además que las células respondedoras a los estímulos fueron tanto T CD4+ como CD8+. Es importante recalcar que la actividad inmunogénica observada depende de la estructura intacta de las partículas ya que el uso de un detergente como tritón X-100 es capaz de eliminar la capacidad observada de dichas VLPs envueltas (Borio et al., 2012).

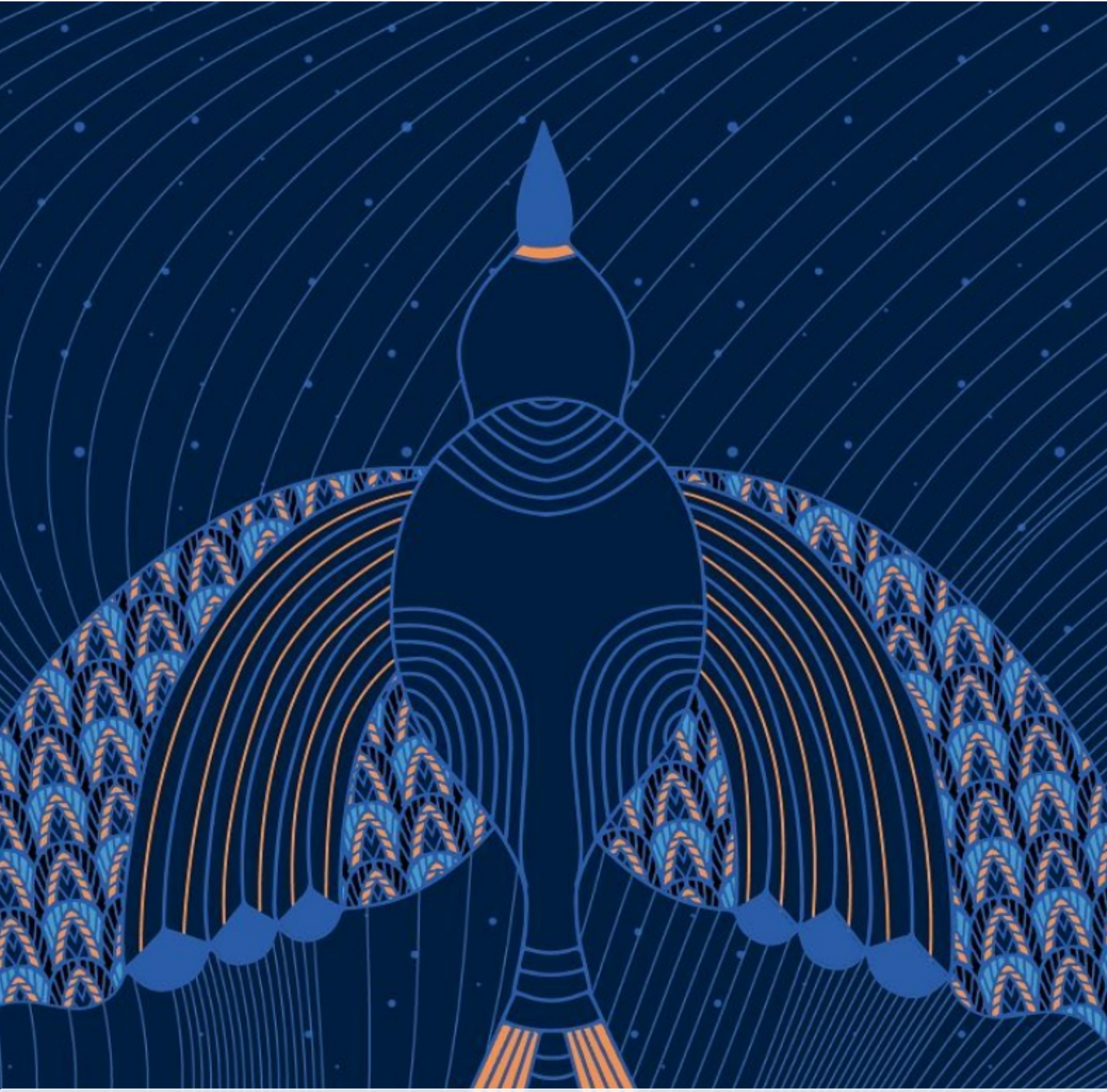
Es interesante resaltar que los efectos observados fueron logrados en ausencia de adyuvantes y eso sería una ventaja ya que se podrían evitar los efectos adversos de dichas sustancias. Además, eso permitiría que las VLPs puedan ser administradas mediante distintas vías que en presencia de adyuvantes no sería posible, tales como: intravenosa, intranasal y oral, entre otras.

Además, las VLPs han demostrado su capacidad de inducir una respuesta inmune a bajas dosis, lo que puede reducir considerablemente los costos de inmunización. En este caso, la carga aproximada de eGFP en las $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ es 2,37 µg de eGFP cada 5 µg de VLPs, dosis que indujo una respuesta inmunológica significativa cuando los linfocitos de ratones inmunizados se encontraron con GFP *ex vivo*. Esta reacción fue lograda utilizando solo 2,37 µg de antígeno, en contraste con la imposibilidad de inducir una respuesta inmunológica de memoria con 5 µg de la proteína GFP pura. Además, esto indica que el sistema de producción de VLPs presentado aquí es mejor que otros sistemas reportados, por ejemplo, hay un trabajo que reportó que 0.0004 µg del antígeno estaba siendo vehiculizado por cada µg de VLP (Molinari et al., 2014).

La posibilidad de disminuir las dosis de antígenos es relevante, especialmente considerando que podrían evitarse los efectos secundarios para proteínas patogénicas. Para este escenario, las $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ fueron capaces de inducir una respuesta inmunológica específica contra eGFP sin demostrar efectos tóxicos dado que no se encontraron diferencias significativas entre el

peso de los animales de los distintos grupos ni cambios significativos de los componentes de la sangre a lo largo de todos los experimentos.

Es así que el modelo de $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ ha mostrado resultados acordes con lo esperado. Para poder seguir indagando en la capacidad de este sistema en el marco del desarrollo de formulaciones con aplicaciones en el campo de la salud, es necesario modificar la proteína indicadora por otra que presente un interés en el campo de las enfermedades infecciosas o crónicas, contemplando las posibilidades de abordajes profilácticos o terapéuticos. Animadas por los resultados que se presentan aquí, hemos avanzado en la realización de proyectos para la vehiculización de diversos antígenos. Por un lado, en el contexto de la pandemia causada por COVID-19 se llevó a cabo el desarrollo de VLPs vehiculizando diversos antígenos del virus. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando el dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína espiga de SARS-CoV-2, y dichas VLPs denominadas $VLPs_{Z\text{-}RBD}$ fueron utilizadas para llevar a cabo ensayos inmunológicos *in vitro* e *in vivo* (manuscrito en preparación). Por otro lado, el reemplazo del marco abierto de lectura de eGFP por los de SAgs virales del MMTV para el desarrollo de una posible terapia contra leucemias y linfomas será abordado en el siguiente capítulo.



CAPÍTULO IV: HERRAMIENTAS PARA LA EXPRESIÓN Y VEHICULIZACIÓN DE SAGS DEL MMTV EN SISTEMAS HETERÓLOGOS

INTRODUCCIÓN

Uso del sistema de VLPs$_Z$ para nuevos desarrollos

Al concluir la caracterización de las VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$, fue posible identificar el gran potencial para constituir una plataforma para la vehiculización de antígenos heterólogos de manera eficiente y segura, estimulando al sistema inmune para dar inicio a una respuesta tanto celular como humoral. Por ello, se procedió a poner a prueba el sistema con un antígeno de interés. En este sentido, la experiencia previa iniciada en el ILEX, en particular las líneas de investigación dirigidas por la Dra. Piazzón, fueron determinantes para diseñar una posible terapia para el tratamiento de leucemias y linfomas T. En este contexto, resulta central poner en relevancia la actividad biológica que poseen los SAgs del MMTV en cuanto a su capacidad para inducir apoptosis específica a determinados clones de los linfocitos T, así como la capacidad inmunomoduladora de las VLPs derivadas de la proteína Z de JUNV, lo cual deriva en una gran estimulación del sistema inmunológico, siendo posible ampliar las vías de administración y el direccionamiento de los SAgs hacia las CPAs.

Linfomas y leucemias como objetivo terapéutico

Existe una gran diversidad de leucemias y linfomas. Actualmente, el proceso de diagnóstico y caracterización molecular de dichas patologías se basa particularmente en marcadores moleculares de relevancia, para definir el mejor tratamiento de acuerdo con el tipo de célula neoplásica. Se suelen analizar los marcadores inmunofenotípicos tales como CD3, CD19, CD20 y CD22 y en paralelo se examina la presencia de anormalidades citogenéticas (Emadi & York Law, 2023).

La interacción entre los linfocitos T y los superantígenos es no convencional y tiene una especificidad atípica, basándose en la región Vβ del TCR del linfocito T. La especificidad de la interacción es empírica, pero puede predecirse mediante análisis y modelados bioinformáticos utilizando *docking* molecular. En la **Figura 30** se muestran en forma resumida las especificidades de los cuatro superantígenos con los que se trabajó a lo largo de esta tesis en especies murinas y humanas. Como se puede observar en dicha figura, el único de los cuatro superantígenos con el que se cuenta con información previa es mtv-7, el cual se reportó que interactúa con las regiones humanas V**β**12, V**β**13, V**β**15 y V**β**23 (Labrecque et al., 1993). Esta última variante tiene una ligera homología con su contraparte murina (entre 44 y 56%), pero se ha determinado empíricamente que la interacción ocurre. Además, en dicho trabajo se confirma que los linfocitos T humanos poseen los componentes estructurales requeridos para responder a SAgs murinos.

Figura 30. Especificidades de interacción de superantígenos en ratones y en seres humanos. Basado en Golovkina et al., 1997; Labrecque et al., 1993.

Superantígenos del MMTV

En el **Capítulo 1** se presentaron los SAgs del MMTV, su rol en la infección viral y la estructura de los mismos. Además, se aclaró que aún no se cuentan con estructuras cristalizadas de tales como para predecir su plegamiento y la interacción con otros componentes celulares de interés. Un trabajo de 1995 muestra que fue posible la expresión y la purificación de dos versiones de mtv-7 en sistemas de *E. coli,* pero no pudo lograrse en su forma soluble (Mottershead et al., 1995). Desde ese entonces, no existen estudios científicos que hayan logrado purificarlo en su forma soluble. Además, todos los trabajos previos utilizan el virus completo en sus experimentos, en lugar de enfocarse solo en las proteínas responsables de la linfotoxicidad, incluyendo los antecedentes generados en el IMEX.

Caracterización de variantes de MMTV en ILEX

En el bioterio del IMEX (ex ILEX), se contaba con distintas cepas de ratones, tanto portadoras de MMTV endógenos como exógenos. En ese sentido, el grupo de investigación dirigido por la Dra. Isabel Piazzón llevó a cabo la caracterización de múltiples linajes de ratones y los MMTV que portaba cada uno, en función de cómo se veía afectado su repertorio de linfocitos T (**Tabla 20**).

Por un lado, hay dos cepas de ratones nombradas LOR y ETO, en honor a la Parroquia Nuestra Señora de Loreto que se encuentra a tan sólo 350 metros de la Academia Nacional de Medicina. Por otro lado, el linaje LA es recombinante y tanto su identificación como caracterización pueden observarse en un trabajo publicado en 1997 (Golovkina et al., 1997). En dicho trabajo científico se reportó el hallazgo de la cepa de MMTV LA, un virus exógeno que se sugiere que surgió de la recombinación entre el SAg endógeno mtv-7 y el virus exógeno MMTV BALB14. Además, las autoras sugieren que el sitio de recombinación se encuentra entre las bases 721 y 789 ya que hasta la base 720 la secuencia es idéntica a BALB14 y el nucleótido 890 es específico para mtv-7.

Las cepas murinas que se encontraban disponibles en ese entonces eran varias, incluyendo ratones AKR, BALB/cJ y luego varios experimentos incluían la generación de retrocruzas interespecie. La particularidad de los ratones BALB/cJ, es que poseen el fenotipo H-2d Mtv7^{-}, por lo que no poseen el SAg endógeno mtv-7 y al portar la variante H2d del MHC, se han podido hacer análisis de restricción de la actividad de los SAgs en dichas condiciones.

Cepa murina	Nombre de linaje murino	Variantes de MMTV que porta	Fenotipo
BALB/cJ	LA	BALB2, BALB14 y LA	Vβ2^{-} Vβ6^{-} Vβ14^{-}
BALB/cJ	LOR$^{\#}$	LA	Vβ6^{-} Vβ7^{-} Vβ8.1^{-} Vβ9^{-}
BALB/cJ	ETO*	mtv-7 endógeno	Vβ6^{-}
BALB/cJ	PV$^{\#}$	LA	Vβ6^{-} Vβ7^{-} Vβ8.1^{-} Vβ9^{-}

Tabla 20. Resumen de las cepas y linajes murinas cuyas muestras derivadas se utilizaron en este trabajo. Se muestran los detalles de cepa murina, las variantes de MMTV que portan, así como su fenotipo relacionado con el repertorio de linfocitos T de las cuatro líneas de ratones. * La línea murina ETO tenía el virus recombinante LA obtenido igual que PV y LOR, pero luego lo perdió a través de las sucesivas generaciones. $^{\#}$ Obtuvieron el virus por pasajes sucesivos.

SAgs para el tratamiento de linfomas y leucemias

El equipo liderado por la Dra. Piazzón además de trabajar con SAgs del MMTV, trabajó con SAgs bacterianos. De hecho, las publicaciones más recientes del grupo se corresponden con trabajos en los cuales se utilizó el SAg bacteriano SEE. En un modelo murino de leucemia tras inoculación de células Jurkat se pudo observar que el tratamiento con SEE logró una reducción drástica del tamaño de los tumores que surgieron tras el proceso de metástasis. Además, se observó un aumento en la sobrevida de los ratones del grupo tratado con el SAg. Por otro lado, los resultados *in vitro* sugieren que el mecanismo de apoptosis involucra la vía extrínseca Fas/Fas ligando (Duarte et al., 2023).

En el **Capítulo 1** se han presentado los SAgs bacterianos, los cuales poseen gran importancia clínica por la diversidad y gravedad de las reacciones que causan al estar presentes en los seres humanos. Algunos de los mismos son considerados armas biológicas, catalogadas como bioterrorismo Categoría B por el *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (Ahanotu et al., 2006). Además, su efecto puede ocurrir a muy bajas concentraciones, ya que se estima que la dosis letal 50 es de 0,02 µg/kg de masa corporal para los seres humanos, tras inhalación del mismo (Fries & Varshney, 2013). Es por ello que para poder utilizarlos para un desarrollo terapéutico habría que modificar las posiciones aminoacídicas que se conoce que aportan toxicidad, pero a la vez evitando modificar las regiones que otorgan la funcionalidad. En contraste, los SAgs virales tienen una acción más lenta, moderada y si bien colaboran en el comienzo o desarrollo de determinadas patologías,

su toxicidad no se puede comparar con el de los SAgs bacterianos. Además, cuentan con la ventaja de que no hay que modificarlos para poder utilizarlos en seres humanos.

En este sentido, con la finalidad de evaluar la potencialidad de un nuevo tratamiento para leucemias y linfomas T basado en SAgs del MMTV, los objetivos de este capítulo son

- vehiculizar los SAgs en VLPs derivadas de la proteína Z del virus Junín y evaluar la eficacia del sistema.
- expresar los SAgs de MMTV como subunidades en un sistema de expresión basado en bacterias.

Los materiales y métodos de este Capítulo se encuentran detallados en la Sección II, páginas 67 a 88.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Generación de las herramientas de vehiculización y expresión

Estrategia del clonado molecular

Para comenzar el proyecto se diseñaron los *primers* que permiten la amplificación de los marcos abiertos de lectura completos de cuatro SAgs virales. Por un lado, se seleccionó mtv-7 que se considera el SAg universal ya que es el SAg de MMTV más estudiado y del que más información se cuenta. Por otro lado, se seleccionaron BALB2, BALB14 y LA que son tres variantes de MMTV caracterizadas en el Laboratorio de Leucemia Experimental.

Dado que uno de los objetivos es el clonado de los ORF fusionados a Z, el oligonucleótido *con* orientación sentido porta una secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción BamHI, algunas bases recomendadas para optimizar la digestión enzimática, la secuencia de unión única y luego la secuencia específica del comienzo del ATG del SAg. Asimismo, los oligonucleótidos con orientación antisentido portan la secuencia de reconocimiento de la enzima NotI, acompañada por algunas bases que hacen que la reacción sea más eficiente y la secuencia final del marco abierto de lectura, incluyendo el codón de *stop*. El uso de las enzimas de restricción permitió un clonado direccionado en los vectores de expresión. El diseño experimental para obtener la construcción plasmídica de trabajo puede observarse en la **Figura 31**.

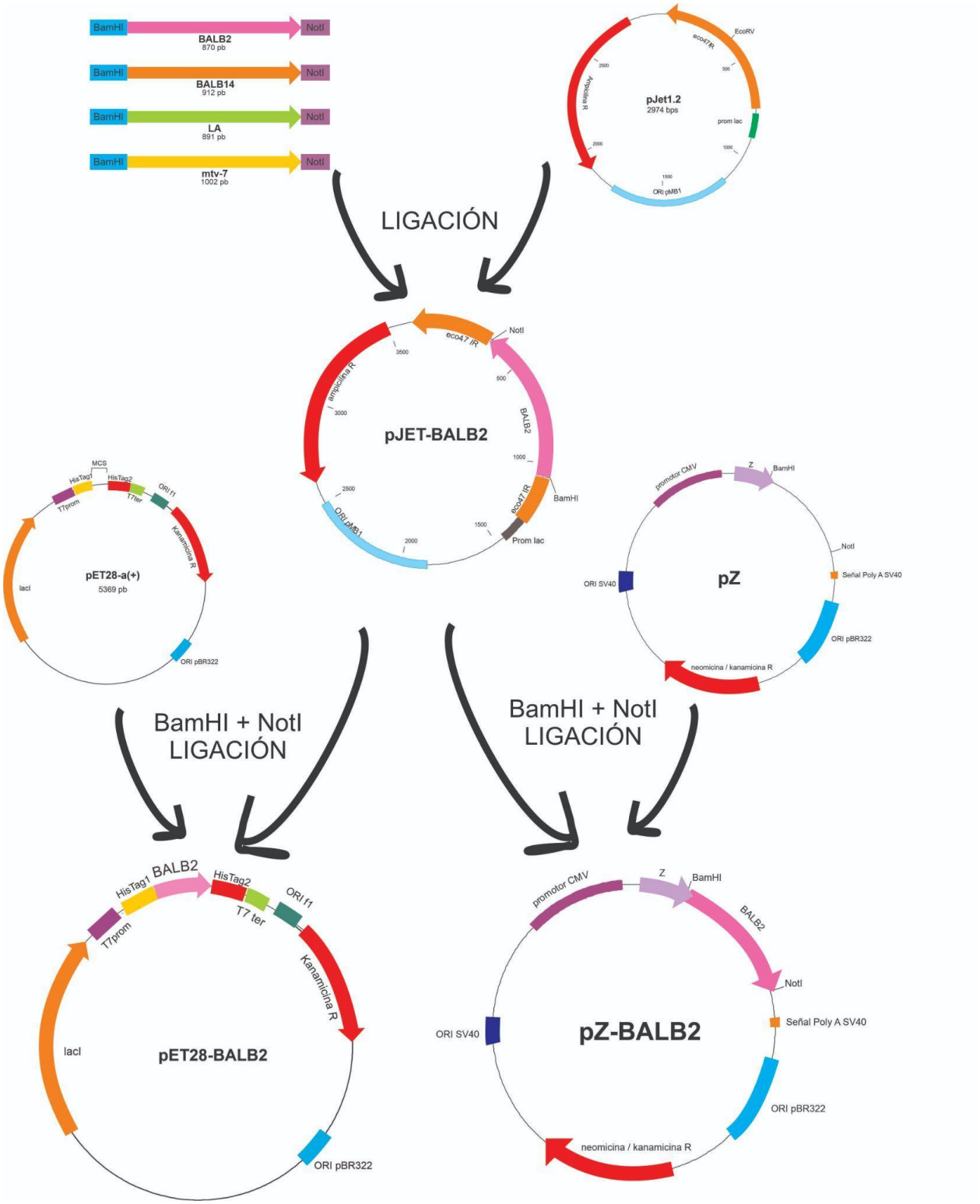


Figura 31. Estrategia molecular para el clonado de los cuatro SAgs de MMTV. De forma representativa se muestra el esquema de clonado para el SAg BALB2. Cada una de las secuencias codificantes para los cuatro SAgs se obtienen mediante reacciones de amplificación utilizando distintos materiales de partida y combinaciones de *primers*. El amplicón obtenido se ligó con el vector pJET 1.2 BLUNT, dando lugar a las construcciones pJET-SAgs. Todos los clones resultantes son recombinantes, dado que dicho vector posee el gen eco47IR que genera un metabolito tóxico para células bacterianas (mostrado en color naranja),

regulado bajo el promotor lactosa (lac, representado en gris). Finalmente se liberó el inserto correspondiente a cada SAg, representado como BALB2 en este caso mediante la digestión enzimática con BamHI y NotI. Luego se llevaron a cabo ligaciones con los vectores de expresión pZ o pET-28a (+). Las secuencias de los genes de resistencia para los distintos antibióticos se muestran en color rojo y los orígenes de replicación procariotas se muestran representados en color celeste. Además, se muestra el origen de replicación eucariota derivado del Simian *Virus* 40 (SV40) en color azul, la secuencia de poliadenilación también derivada de SV40 en naranja y el promotor de Citomegalovirus (CMV) en color violeta.

Obtención de los insertos

Considerando la forma de transmisión de cada uno de los virus que dan origen a los SAgs, se utilizaron distintos materiales de partida para obtener los insertos. Un resumen de ello se puede observar en la **Tabla 21**.

Inserto	Material de partida	Nombre de muestra	*Primers*
mtv-7	cDNA de una mezcla de placas de Peyer de retrocruzas de ratones BALB/c x AKR	LA1	mtv-7 Fw y mtv-7 Rv
BALB2	cDNA de tumores de glándula mamaria de ratones de distintos linajes	LA 57 bis	BALB2 Fw y BALB2 Rv
BALB14		LA206	BALB14 Fw y BALB14Rv
LA			BALB14 Fw y mtv-7 Rv

Tabla 21. Resumen del origen de las muestras para obtener los insertos y los *primers* utilizados para cada uno. Se muestran los nombres de los insertos, el material de partida considerando que mtv-7 es endógeno mientras que el resto son exógenos, el nombre de las muestras a partir de las cuales se obtuvieron finalmente los productos de amplificación y los *primers* utilizados. Las condiciones de reacción y los perfiles de ciclado se detallan en Materiales y Métodos.

Para la amplificación de mtv-7 se tuvo que recurrir a muestras previas del IMEX ya que ya que en el Bioterio del IMEX ya no se crían ni mantienen ratones AKR. Al desconocer cuál de todas las muestras encontradas podrían ser útiles para amplificar el fragmento deseado, se realizaron diversas reacciones de PCR utilizando todas las muestras como molde, cada una por separado (**Figura 32A)**.

Por otro lado, para obtener los insertos correspondientes a BALB2, BALB14 y LA se accedieron a muestras almacenadas en los tanques de nitrógeno y se procedió a extraer el ARN total, sintetizar el ADN complementario y utilizar dicho material como molde en las reacciones de PCR (**Figura 32B**). En ese sentido, la selección de las muestras se realizó en base a lo descrito en la **Tabla 20**.

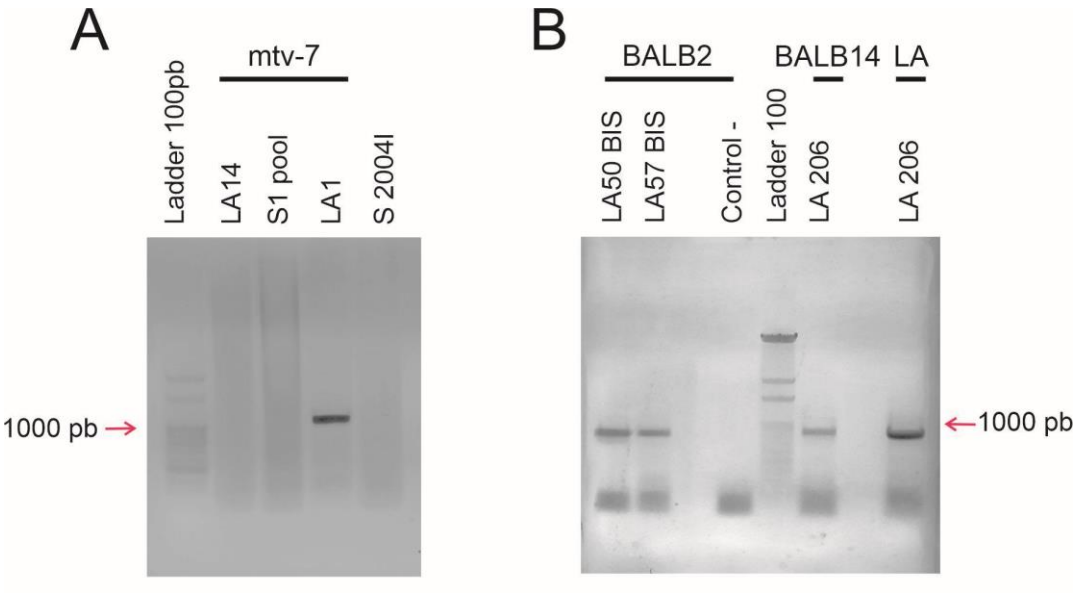


Figura 32. Productos amplificados correspondientes a los fragmentos del ORF de los cuatro SAgs de MMTV. En ambos casos se utilizaron marcadores de peso molecular para utilizar como referencia y con una flecha rosa se señala la posición aproximada de 1kpb. **A. Obtención del marco abierto de lectura del SAg mtv-7.** En la primera calle se observa el marcador de peso molecular 100pb y el resultado de las PCR utilizando cuatro muestras de partida como molde. La única muestra que permitió obtener el fragmento deseado fue "LA1" correspondiente a la calle número 4 del gel de agarosa. El tamaño esperado de mtv-7 es de 1002 pb. **B**. **Obtención del marco abierto de lectura de los SAgs BALB2, BALB14 y LA.** En la quinta calle se observa el marcador de peso molecular comercial 100pb (PB-L) y el resultado de las PCR utilizando tres muestras de partida distintas y diversas combinaciones de los *primers*. En el caso de BALB2 las dos muestras utilizadas demostraron amplificación en el tamaño deseado (~870 pb), mientras que la muestra LA206 permitió la amplificación de los marcos abiertos de lectura de BALB14 (~912 pb) y LA (tamaño desconocido). También se muestra que el control negativo utilizando los *primers* de BALB2 no produjo un producto de amplificación en los tamaños esperados, descartando que lo observado sea producto de una contaminación.

Los fragmentos de ADN obtenidos a partir de la amplificación fueron recuperados de los geles de agarosa y purificados mediante el uso de una solución de sílica. Posteriormente se procedió a ligar dichos fragmentos con el vector comercial pJET 1.2 *BLUNT*. La ligación se llevó a cabo durante toda la noche a 4°C y posteriormente se transformaron las mezclas a bacterias *E. coli* XL1 BLUE competentes térmicas y fueron sembradas en medio sólido LB con ampicilina.

Para seleccionar los clones que portan las secuencias esperadas se realizó un análisis de recombinantes mediante la técnica de PCR de colonias. Inicialmente para mtv-7 se llevó a cabo utilizando los *primers* específicos del plásmido comercial que vienen en el kit: pJET 1.2 Fw y pJET 1.2 Rv. Se utilizó la *Taq* Pegasus (PB-L) con las concentraciones estándares para PCR y el perfil de ciclado "pJET" que se detalla en la Sección II **(Tabla 5).**

Al evaluar las construcciones restantes, se realizaron dos mezclas de reacción distintas: las mezclas A se encontraban compuestas por los *primers* T7 y los *primers Reverse* específicos de cada inserto (por separado) y, por otro lado, las mezclas B contenían a los *primers* T7 y los *primers Forward* específicos de cada inserto (por separado). Los fragmentos de amplificación presentaron tamaños entre 983 y 1280 pb (**Tabla 22)**.

Construcción	Mezcla A: T7 + Rv específico	Mezcla B: T7 + Fw específico
pJET-BALB2	1001 pb	1138 pb
pJET-LA	983 pb	1280 pb
pJET-BALB14	1004 pb	1145 pb

Tabla 22. Detalle de los *primers* utilizados en las mezclas A y B de la PCR de colonias en las construcciones pJET-SAgs. Se muestran los tamaños esperados de los fragmentos en cada caso. Se utilizó el perfil de ciclado "T7+esp" que se muestra en **Materiales y Métodos**.

Los resultados de las PCR de colonias se muestran en la **Figura 33**.

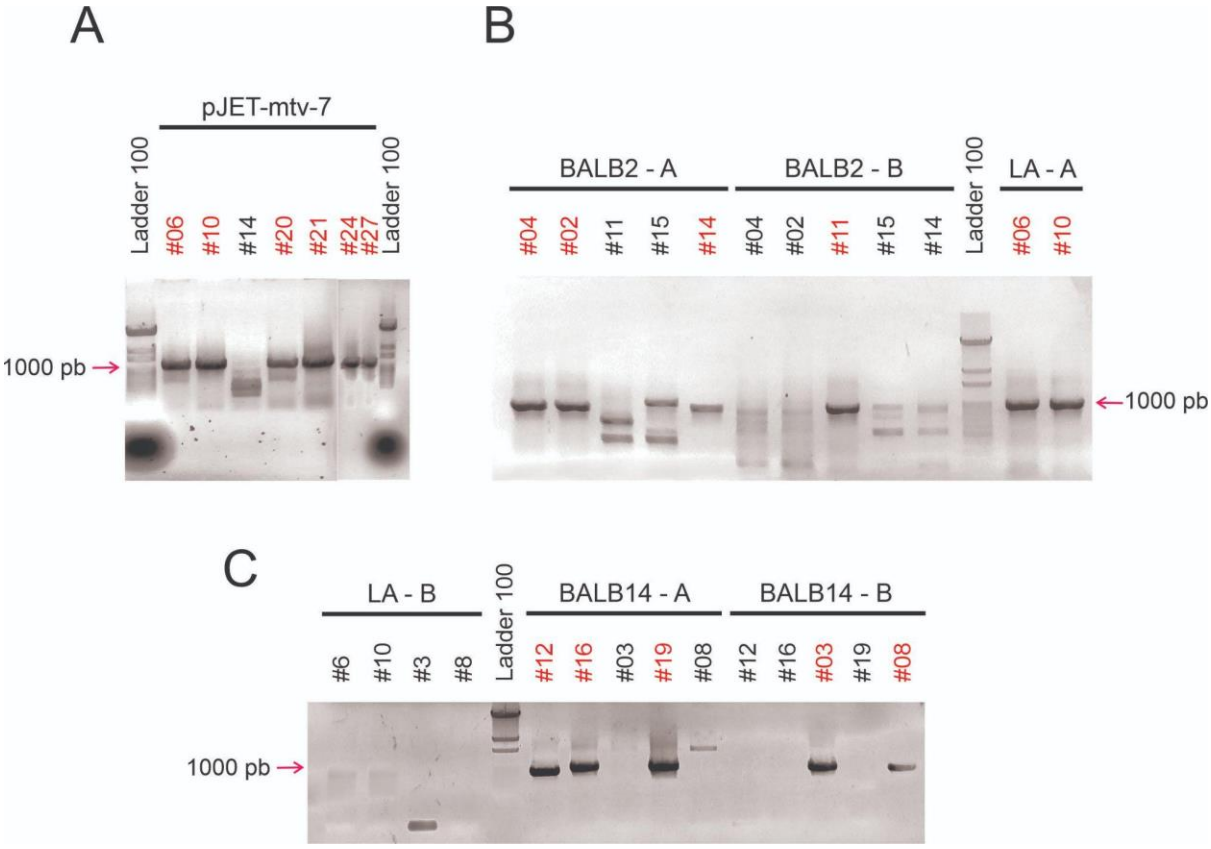


Figura 33. PCR de colonias para la identificación de recombinantes con mezclas de *primers* universales y específicos. Visualización de las electroforesis analíticas en geles de agarosa 0,8% m/v de los productos de PCR. En rojo se indican las colonias recombinantes seleccionadas. **A. Construcción pJET-mtv7.** El producto esperado tiene un tamaño de 1121 pb. **B. Construcciones BALB2, BALB14 y LA.** La mezcla A refiere al empleo de los *primers* T7 y Rv específicos para cada

inserto mientras que la mezcla B contenía a T7 y Fw específicos de cada inserto. **C. Construcciones BALB2, BALB14 y LA.**

Las colonias seleccionadas fueron inoculadas en cultivos líquidos con ampicilina tanto para almacenar *stocks* de cada una de las mismas con glicerol a -80°C, como para extraer el ADN plasmídico mediante miniprep por lisis alcalina y precipitación alcohólica. Inicialmente se verificó que el material genético purificado se encuentre íntegro y tenga suficiente cantidad como para avanzar en las digestiones. Se seleccionó la enzima BglII, esperando obtener perfiles de digestión diferenciales ante la presencia de los insertos deseados (**Figura 34**).

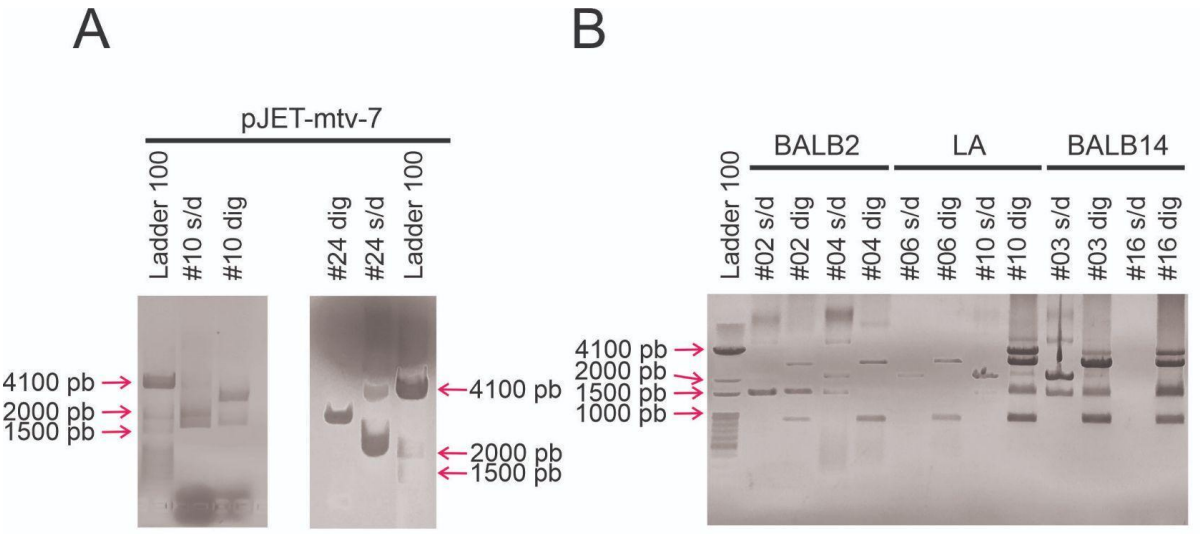


Figura 34. Mapas físicos tras digestión con la enzima BglII. A. Análisis de las colonias #10 y #24 de pJET-mtv-7. Se observan las calles correspondientes al marcador de peso molecular 100, la muestra sin digerir y la muestra digerida. El patrón de digestión esperado es de 2928 pb + 1048 pb en caso positivo y de 2928 pb y 46 pb en caso negativo. **B. Análisis de diversas colonias de pJET-BALB2, pJET-LA y pJET-BALB14.** Para la construcción pJET-BALB2 se esperaba que tras la digestión se generen dos fragmentos: uno de 1181 pb y otro de 2928 pb. En el caso de la construcción pJET-LA se esperan dos fragmentos: uno de 937 pb y otro de 2928 pb. Para pJET-BALB14 el patrón de digestión esperado consta de 3 fragmentos: uno de 2928 pb, otro de 1138 o 1118 pb y otro de 13 o 31 pb, dependiendo del sentido de inserción en el plásmido. Se observan las calles correspondientes al marcador de peso molecular 100pb (PB-L), las muestras sin digerir y las muestras digeridas.

Como se puede observar en la **Figura 34A**, la colonia pJET-mtv7#10 digerida demostró el patrón de digestión esperado. Al analizar la colonia #24, hubo un problema técnico con el marcador de peso molecular, pero se pueden visualizar todos los fragmentos esperados, aunque algunos en forma tenue. Se avanzó con ambos clones.

Como se puede apreciar en la **Figura 34B**, en la colonia pJET-BALB2 #02 se obtuvieron al menos 3 fragmentos: dos que coinciden con el patrón de digestión esperado y otro que podría ser plásmido sin digerir. En la colonia #04 se encuentran al menos dos

fragmentos: uno de aproximadamente 1000 pb y otro de aproximadamente 3000 pb. Como se observó el fragmento de aproximadamente 1000 pb en ambas colonias, se puede decir que son positivas. También en la **Figura 34B** se nota que la colonia pJET-LA #06 digerida presenta un patrón de digestión compatible con el esperado. Con respecto a la colonia #10, se observa una gran cantidad de fragmentos, pero como ambas colonias presentaron el fragmento de aproximadamente 1000 pb, se consideró que el mapa físico demostró un resultado positivo y se avanzó con las dos. Como se puede apreciar en la **Figura 34B**, tanto la colonia pJET-BALB14 #03 como la #16 digeridas presentan al menos cuatro fragmentos. Como se observó el fragmento cercano a 1000 pb, se considera que son positivas para dicho análisis y se avanzó con ambas.

A partir de un nuevo cultivo líquido de las colonias seleccionadas, se realizó la purificación del ADN plasmídico mediante el uso del kit comercial Puro Plásmido (PB-L) con el fin de enviar a secuenciar (Macrogen Inc.) con los *primers* universales pJET 1.2 Fw y pJET 1.2 Rv.

Una vez obtenidos los resultados, se alinearon con las secuencias generados *in silico* de los clonados y se comprobó la identidad de las secuencias mediante el uso de BLASTn. En el caso de pJET-mtv-7 se halló un 96% de identidad considerando una cobertura del 91% con la secuencia M90535.1 en dicha base de datos y un 100% de coincidencia entre los clones #10 y #24. Dado que es un aislamiento particular de una muestra local, es lógico que haya variabilidad en las secuencias o polimorfismos. Las siguientes etapas se continuaron con el clon #10 porque sus cromatogramas contaban con mayor calidad en la cobertura de la secuencia.

Con respecto a pJET-BALB2, una vez obtenidas las secuencias se seleccionó la colonia #2, observando un 94% de identidad con la secuencia de referencia (U71271). En relación a pJET-BALB14, se avanzó con la colonia #16, determinando un 92% de identidad con la secuencia de referencia (U71270.1).

Sobre pJET-LA se continuó con el clon #10 porque posee más coincidencia con las secuencias de referencia, a pesar que dicha secuencia en bases de datos se hallaba incompleta.

Transferencia de los insertos a los vectores de expresión

Una vez verificadas las secuencias y seleccionados los clones finales a utilizar, se procedió a la transferencia de los ORFs. Para ello, se liberaron los insertos mediante y se linealizaron los plásmidos destino mediante la digestión con las enzimas BamHI y NotI. Luego de las digestiones enzimáticas se sembraron los productos de digestión en geles de agarosa 0,8% m/v y se observó la presencia de los fragmentos correspondientes, como se muestra

en la **Figura 35**. Los diferentes productos obtenidos fueron recuperados de las electroforesis para su purificación.

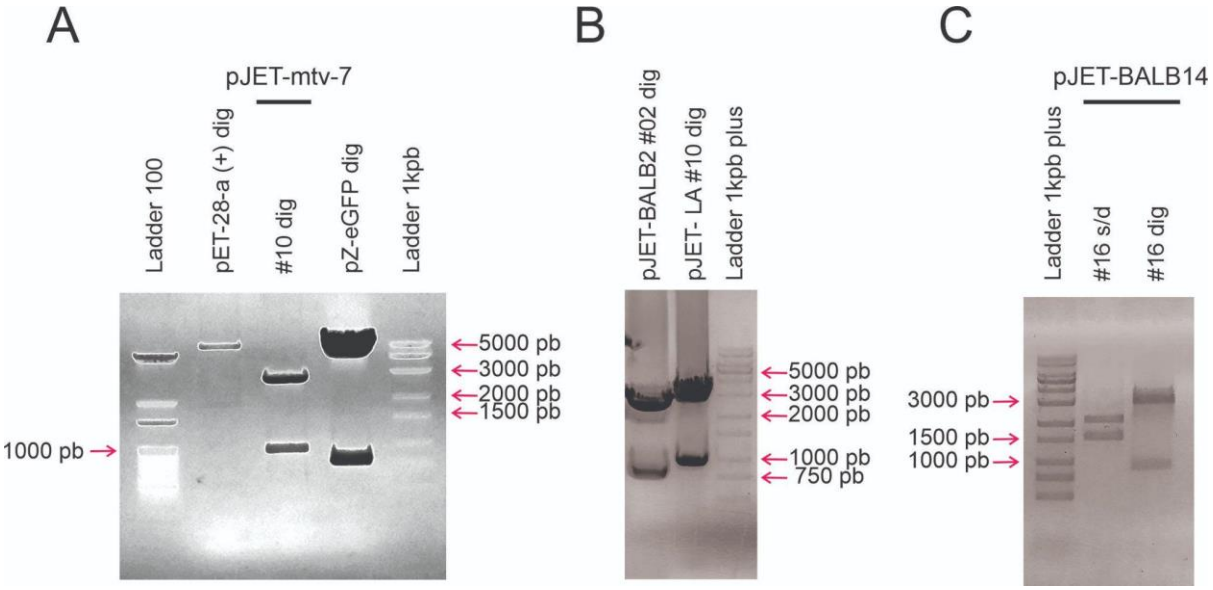


Figura 35. Liberación de fragmentos requeridos para las posteriores ligaciones tras digestión con BamHI y NotI. A. Digestión de los vectores finales y liberación del SAg mtv-7. Como referencia para los tamaños se observan los *ladders* 100 y 1kpb en las calles 1 y 5, respectivamente. En la calle correspondiente al plásmido pET-28-a (+) se observa únicamente el fragmento correspondiente al vector sin inserto. En la calle correspondiente al plásmido pZ-eGFP se observa la liberación del fragmento de eGFP, de 737 pb y, por otro lado, el esqueleto del vector. **B. Liberación de los fragmentos BALB2 y LA.** Como referencia para los tamaños se observan el *ladder* 1kpb plus (PB-L) en la calle 3. **C. Liberación del fragmento codificante del SAg BALB14.** Como referencia para los tamaños se observan el *ladder* 1kpb plus (PB-L) en la calle 1. Además, se incorporó un control del plásmido sin digerir, para observar que el fragmento correspondiente al tamaño esperado se deba a la liberación del ORF de BALB14.

Posteriormente se realizaron las diferentes mezclas de ligación, que se llevaron a cabo durante toda la noche a 4°C. El detalle de las ligaciones y la nomenclatura de los vectores finales se observan en la **Tabla 23.**

Inserto	Vector pET-28-a (+)	Vector pZ
mtv-7	pET28-mtv-7	pZ-mtv-7
BALB2	pET28-BALB2	pZ-BALB2
LA	pET28-LA	pZ-LA
BALB14	pET28-BALB14	pZ-BALB14

Tabla 23. Mezclas de ligación y nomenclatura de los vectores finales. A la izquierda se muestran los cuatro insertos correspondientes a las variantes de los SAgs de MMTV. En el centro se muestran las mezclas de ligación correspondientes a la generación de las construcciones pET28-SAgs para la

expresión en sistemas de bacterias. A la derecha se muestran las mezclas de ligación correspondientes a las construcciones pZ-SAgs para la vehiculización de los mismos en VLPs utilizando células de mamíferos.

Una vez transcurrido el tiempo para las ligaciones, las construcciones se transfirieron a bacterias *E. coli* XL1 BLUE mediante un protocolo de transformación térmica y fueron sembradas en medio de cultivo LB sólido con kanamicina.

Selección de colonias recombinantes

Inicialmente se evaluaron las colonias recombinantes mediante PCR de colonias. Para las construcciones pET28-SAgs se utilizaron los *primers* universales T7 prom y T7 ter, mientras que para las construcciones pZ-SAgs se utilizaron los primers universales CMV prom y SV40 ter. Los perfiles de ciclado utilizados se muestran en la **Sección II** como "pET28" y "pZ" (**Tablas 7 y 8**, respectivamente). Los resultados de dicho análisis se muestran en la **Figura 36**, donde los nombres de las colonias positivas se muestran en rojo.

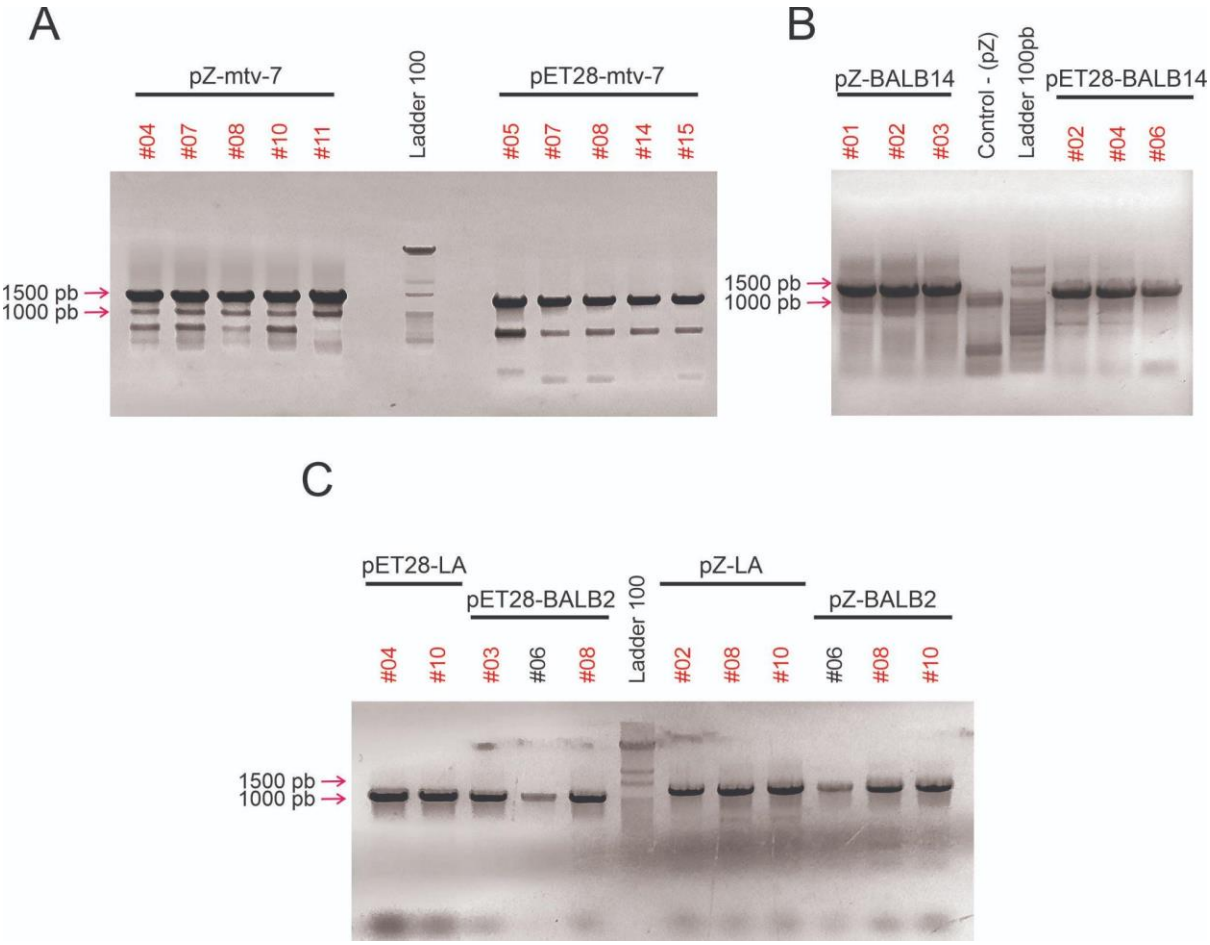


Figura 36. Análisis de colonias recombinantes mediante PCR de colonias. A. Análisis de las colonias transformadas con las construcciones pZ-mtv-7 y pET28-mtv-7. Los tamaños esperados

son de 1271 pb para pET28-mtv-7 y 1445 pb para pZ-mtv-7**.** En la calle número 7 se utilizó el *ladder* 100 como referencia para los tamaños de los productos. **B. Análisis de las colonias transformadas con las construcciones pZ-BALB14 y pET28-BALB14.** Los tamaños esperados son de 1180 pb para pET28-BALB14 y de 1354 pb para pZ-BALB14. Como referencia para los tamaños de los productos se utilizó el *ladder* 100pb (PB-L) en la calle 5 y además se realizó un control negativo de pZ sin molde en la calle 4. **C. Análisis de las colonias transformadas con las construcciones pZ-LA, pZ-BALB2, pET28-LA y pET28-BALB2.** Los tamaños esperados son de 1160 pb para pET28-LA, 1139 pb para pET28-BALB2, 1334 pb para pZ-LA y de 1313 pb para pZ-BALB2**.** En la calle número 6 se utilizó el *ladder* 100 como referencia para los tamaños de los productos.

Como se puede observar en las **Figuras 36A, B y C**, todas las colonias analizadas demostraron la amplificación de un fragmento cercano a las 1500 pb, compatible con los tamaños esperados. En este sentido, se podría considerar que todas las colonias analizadas fueron positivas. En función de la intensidad de las bandas obtenidas, se descartaron los clones pET28-BALB2 #06 y pZ-BALB2 #06, continuando los análisis con el resto.

Para seleccionar los clones definitivos, se llevó a cabo un análisis de mapas físicos mediante el uso de enzimas de restricción. Para ello se avanzó en la purificación de los ADN plasmídicos de algunas de las colonias positivas para la PCR de colonias y las mismas se digirieron utilizando distintas enzimas de restricción. La construcción pET28-mtv-7 fue digerida utilizando la enzima HincII, mientras que la construcción pZ-mtv-7 fue digerida utilizando la enzima PstI cuyos resultados se muestran en la **Figura 37**. El nombre de las colonias que se consideraron positivas se muestra en color rojo.

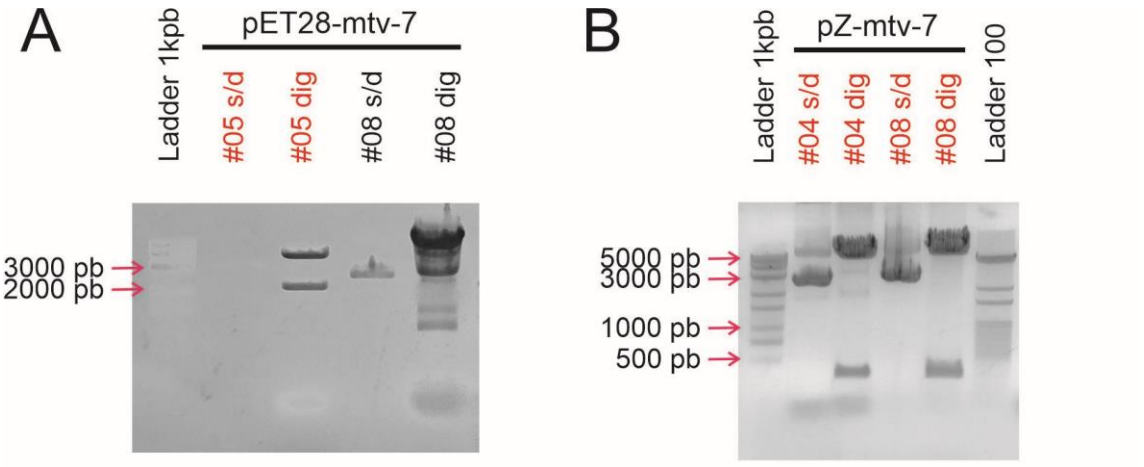


Figura 37. Análisis de colonias recombinantes mediante mapa físico utilizando enzimas de restricción. A. Análisis de la construcción pET28-mtv-7 utilizando la enzima HincII. Para cada colonia se muestra su control sin digerir. Los fragmentos esperados son de 4087 pb, 2158 pb y 77 pb. En caso de ser pET28a religado, solo debe observarse el plásmido lineal, de un tamaño de 5337 pb. En la calle número 1 se utilizó el *ladder* 1kpb como referencia para los tamaños de los productos. **B. Análisis de la construcción pZ-mtv-7 utilizando la enzima PstI.** Para cada colonia se muestra su

control sin digerir. El patrón esperado es de dos fragmentos de 4927 pb y 323 pb. En la calle número 1 se utilizó el *ladder* 1kpb y en la calle 6 el *ladder* 100, como referencia para los tamaños de los productos.

Como se observa en la **Figura 37A**, la colonia #05 digerida muestra los fragmentos de aproximadamente 4000 pb y 2000 pb, por lo que se puede considerar positiva. Por otro lado, la colonia #08 demostró demasiados fragmentos y probablemente un exceso de material genético en la mezcla de digestión, por lo que se continuó con la colonia #05. Como se observa en la **Figura 37B**, al analizar las digestiones de las colonias #04 y #08 se generaron dos fragmentos: uno de aproximadamente 5000 pb que no avanzó demasiado en el frente de corrida por tener demasiada cantidad de material genético, y otro fragmento con un tamaño menor a 500 pb. En ese sentido, pueden considerarse ambas colonias como positivas.

Para el resto de las construcciones no se realizaron análisis de mapas físicos utilizando enzimas de restricción. Sin embargo, previo a su uso se llevó a cabo la secuenciación de los clones pET28-mtv-7 #05, pET28-BALB2 #08 y pET28-LA #04.

Una vez obtenidas las secuencias, se procedió con la transferencia a la cepa de expresión *E. coli* Rosetta, mediante transformación térmica. Las colonias recombinantes obtenidas fueron analizadas para verificar la integridad del plásmido en las bacterias transformadas. Se realizó una PCR de colonias utilizando los *primers* t7 prom y t7 ter, utilizando el perfil de ciclado “pET28” que el que se muestra en la **Sección II**. Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 0,8% m/v y se muestran en la **Figura 38**. El tamaño de los productos de amplificación se encuentra entre 1139-1271 pb.

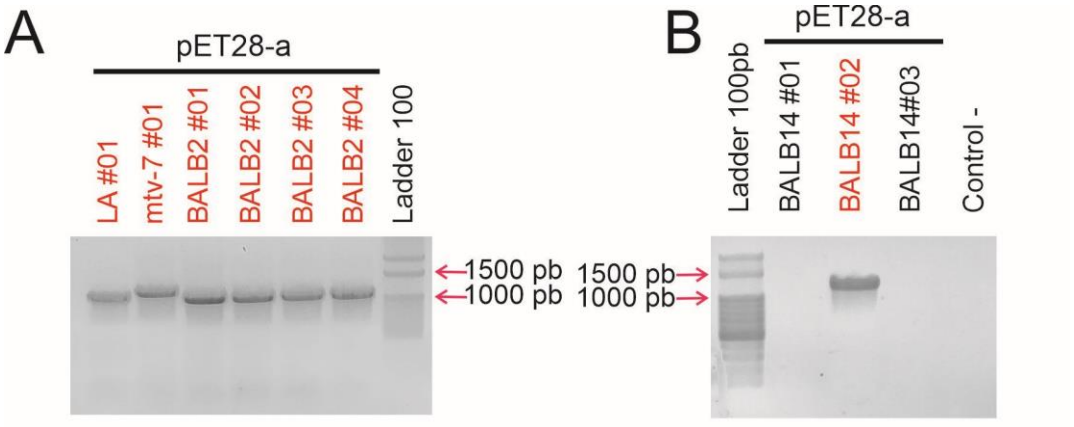


Figura 38. Análisis de colonias de *E. coli* Rosetta transformadas mediante PCR de colonias. A. Análisis de las construcciones pET28-BALB2, mtv-7 y LA. En la calle número 7 se utilizó el *ladder* 100 como referencia para los tamaños de los productos. **B. Análisis de la construcción pET28-**

BALB14. En la calle número 1 se utilizó el *ladder* comercial 100 pb (PB-L) y en la calle 5 se muestra el control negativo.

Como se puede observar en la **Figura 38A**, todas las colonias evaluadas portaban las construcciones deseadas, ya que puede observarse un producto de amplificación cuyo tamaño se encuentra entre 1000 y 1500 pb. En cambio, para la construcción pET28-BALB14 se encontró únicamente una colonia positiva, la #02 (**Figura 38B**).

En función de dichos resultados, se decidió trabajar con los siguientes clones: pET28-BALB2 #02; pET28-BALB14 #02; pET28-LA #01; pET28-mtv-7 #01. Dichas construcciones fueron utilizadas para expresión de proteínas en sistemas bacterianos, cuyos resultados se muestran a partir de la página 144.

Con respecto a las construcciones pZ-SAgs, luego de la PCR de colonias que se muestra en la **Figura 36**, se seleccionaron los clones pZ-BALB2 #10, pZ-BALB14 #03, pZ-LA #10 y pZ-mtv-7 #04 para llevar a cabo la expresión en cultivo de células de mamíferos. Dichas construcciones fueron utilizadas para vehiculización de los SAgs en VLPs derivados de la proteína Z de JUNV, cuyos resultados se muestran en la página 158.

Análisis bioinformático

El trabajo realizado en este capítulo comenzó con el uso de las secuencias curadas en la base de datos del NCBI: U71271 (BALB2), U71270 (BALB14) y U71272 (LA). Sin embargo, las dos primeras eran aislamientos particulares previos y la tercera, es una secuencia parcial. Es por ello que de por si acceder a las secuencias de los SAgs con los cuales se estaba trabajando es novedoso *per se*.

En función de las secuencias obtenidas se realizaron alineamientos entre sí para determinar regiones conservadas ya que son variantes de un mismo gen (**Figura 39**).

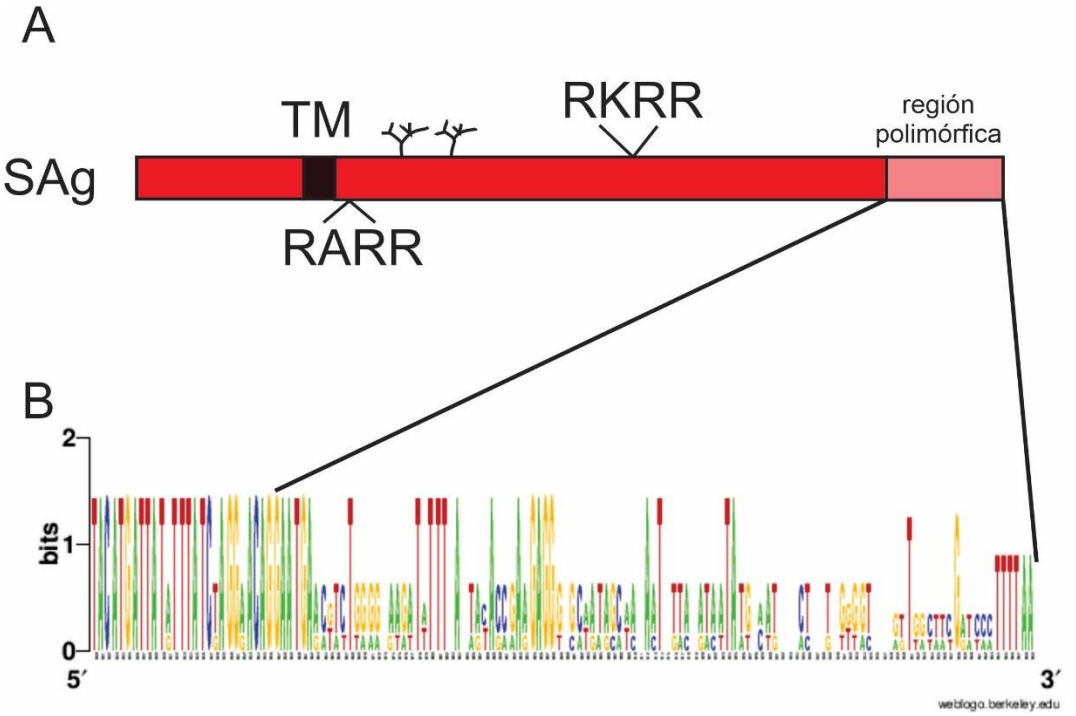


Figura 39. Variación en las secuencias nucleótidos de los SAgs. A. Estructura general de los SAgs del MMTV. **B. *Sequence logo* de la región 3' de los ORF de los SAgs.** Se muestra la región entre las bases 830 a 969 del alineamiento.

A partir de lo observado en la **Figura 39** se puede afirmar que los cuatro SAgs con los cuales se trabajó en esta tesis poseen conservación de la secuencia en su región 5', mientras que se observan polimorfismos en la región 3'. En este sentido, si se asume que la función está relacionada con la estructura de las proteínas y eso depende de la secuencia de aminoácidos, se esperaría que la especificidad de interacción esté dada por las mutaciones en la región carboxilo terminal, como se ha reportado previamente. De hecho, en un trabajo se produjeron dos variantes de la proteína mtv-7, una con la secuencia completa y otra que es sólo la región carboxilo terminal se observó que la versión más pequeña fue capaz de demostrar misma funcionalidad que la proteína completa (Mottershead et al., 1995).

Asimismo, se realizó la traducción *in silico* utilizando el programa MEGA y se avanzó en el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las cuatro variantes para evaluar la conservación de secuencia y la presencia de diversos dominios (**Figura 40**).

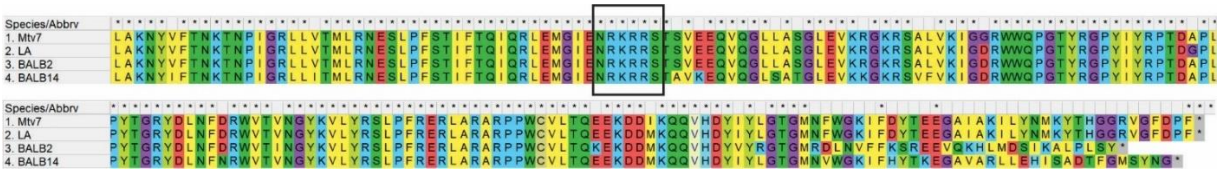


Figura 40. Variación en las secuencias aminoacídicas de los SAgs. Alineamiento parcial de las secuencias aminoacídicas considerando los ORFs de los SAgs mtv-7, LA, BALB14 y BALB2. Las

posiciones marcadas con un * muestran los aminoácidos conservados entre las cuatro secuencias. Con un recuadro negro se muestra la secuencia RKRR, conservada en los cuatro SAgs.

Como se puede observar en la **Figura 40**, al igual que lo encontrado en las secuencias nucleotídicas, hay una conservación en los aminoácidos de los SAgs en la región amino terminal. Al avanzar hacia el carboxilo terminal se encuentran discrepancias entre los aminoácidos de cada una de las variantes. Eso quiere decir que la variación de la secuencia tiene un impacto en la composición aminoacídica de cada una de las proteínas y eso podría ser determinante para la función ya que se ha reportado que poseen distinta especificidad de interacción. En este sentido, el análisis de la región C terminal será relevante para determinar los mecanismos de acción, ya que se ha reportado dicha región es clave para la funcionalidad de la proteína (Wrona et al., 1998). Se puede observar que las dos primeras secuencias (mtv-7 y LA) poseen mucha similitud y eso se debe a que LA es un SAg obtenido de un virus recombinante y que se ha reportado que la región 3' se corresponde con mtv-7. En este caso a pesar de haber aislado los insertos a partir de distintos materiales de partida, se puede confirmar lo expuesto anteriormente (Golovkina et al., 1997). Sumado a esto, se encontró que las cuatro secuencias poseen un dominio RKRR que se encuentra marcado con un recuadro negro, lo cual podría implicar el reconocimiento de la proteasa furina en dicha región.

Conocer las secuencias nos permite continuar construyendo conocimiento sobre estas cuatro variantes de SAgs del MMTV, especialmente utilizando algoritmos de *Machine Learning* tan valiosos como *Alpha Fold*, lo cual está planteado para ser desarrollado durante el seminario de la est. Ornella Flores.

Expresión de SAgs en sistemas bacterianos

Considerando que el objetivo general de esta tesis doctoral es el desarrollo de una terapia contra linfomas y leucemias que implica la vehiculización de SAgs virales del MMTV, al momento de diseñar los ensayos de actividad biológica sería adecuado utilizar el compuesto activo en su forma libre o sin vehiculizar. Ante la imposibilidad de obtener dichas proteínas en forma comercial, nos propusimos la producción y purificación de las mismas, utilizando sistemas bacterianos.

Los SAgs de MMTV son glicoproteínas transmembrana y hay evidencias que indican que las modificaciones postraduccionales serían imprescindibles para su funcionalidad, entonces ocurrir que al producirlos en sistemas procariotas los mismos no tengan actividad. Sin embargo, en el Laboratorio de Virus Emergentes de la Universidad Nacional de Quilmes se cuenta con la experticia y equipamiento necesario para llevar a cabo dicha tarea, además de la amplia experiencia en ello. De esta forma, decidimos que era una buena aproximación para contar con el control para ensayos posteriores.

Análisis bioinformáticos

Al acceder a las secuencias de las construcciones pET28-SAgs, se determinaron las identidades de secuencia y se compararon con secuencias similares que se hallaban en bases de datos de referencia. Las construcciones pET28-BALB2 #08, pET28LA #04 y pET28-mtv-7 #05 mostraron un 100% de coincidencia con las previas de cada uno, por lo que no hubo mutaciones en el proceso de transferencia del inserto al vector de expresión. Sumado a esto, se pudo comprobar que todos los elementos para la correcta expresión se encontraban presentes de manera adecuada.

Además, mediante el uso de herramientas bioinformáticas se determinaron diversas características de fusión proteica SAg-HT tales como tamaño, punto isoeléctrico (pI), presencia de regiones transmembrana y solubilidad de las mismas, cuyos resultados se muestran en la **Tabla 24**.

Proteína	Peso molecular	Cantidad de aminoácidos	pI	Ubicación intracelular	Solubilidad
BALB2-HT	35,9 kDa	315	9.82	Nt dentro de las células, 1 hélice transmembrana entre los aminoácidos 45-62	0.4721
BALB14-HT	36,3 kDa	320	9.77	Nt dentro de las células, 1 hélice transmembrana entre los aminoácidos 45-63	0.4454
LA-HT	36,5 kDa	322	9.56	Nt dentro de las células, 1 hélice transmembrana entre los aminoácidos 45-62	0.4760
mtv-7-HT	40,1 kDa	359	9.69	Nt dentro de las células, 1 hélice transmembrana entre los aminoácidos 82-99	0.3816

Tabla 24. Caracterización de las proteínas SAgs-HT. Las primeras 3 columnas fueron determinadas utilizando la herramienta ProtParam, mientras que la presencia de dominios transmembrana fue predicha mediante el uso de HMMTOP y la solubilidad fue determinada utilizando la herramienta NetSolP - 1.0.

Al analizar la **Tabla 24** se observa que la variante de mayor tamaño de los SAgs-HT es mtv-7-HT, mientras que el resto posee una variación de escasos aminoácidos. En relación al pI, se observa que todas poseen un pI elevado, lo que puede ser problemático para la purificación y su potencial uso, ya que la mayoría de las soluciones suelen tener un pH cercano a 8, en el cual las proteínas se encontrarían portando carga positiva. Por otro lado, las predicciones indican una posible región transmembrana en todas las variantes de las proteínas, en la misma región.

Con respecto a la última columna, los valores mostrados se calculan para encontrarse entre 0 y 1, siendo 1 la mayor solubilidad posible. En general las proteínas con valores mayores a 0.75 se consideran solubles. En este caso se observa que todos los valores son menores a 0.5 y la proteína que peor solubilidad tendría es mtv-7-HT.

Pruebas de expresión a pequeña escala

Una vez obtenidas las construcciones pET28-a portando las cuatro variantes de superantígenos, se procedió a realizar ensayos de expresión utilizando bacterias *E. coli* Rosetta ya que las secuencias no habían sido optimizadas para su expresión en bacterias. En ese sentido, la cepa Rosetta es una variante de las bacterias BL21, pero posee un plásmido con resistencia para cloranfenicol que aporta las secuencias para los ARN de transferencia necesarios para la expresión de proteínas eucariotas.

Se comenzó realizando ensayos individuales con cada una de las construcciones, cuyos inóculos se crecieron *overnight* en LB con cloranfenicol y kanamicina. Para los ensayos de expresión se utilizaron las condiciones estándar: DO_{600} entre 0,6 y 0,9; IPTG a una concentración de 1 mM, 200 rpm y 37°C. Se realizaron réplicas sin inducir con la finalidad de contar con dichos extractos como control. Los ensayos de expresión se llevaron a cabo durante 4 horas post inducción, tomando muestras en tiempo cero, tiempo 1 (2 horas) y tiempo 2 (4 horas). Las pruebas de expresión de las cuatro variantes de los SAgs a pequeña escala se muestran en la **Figura 41**.

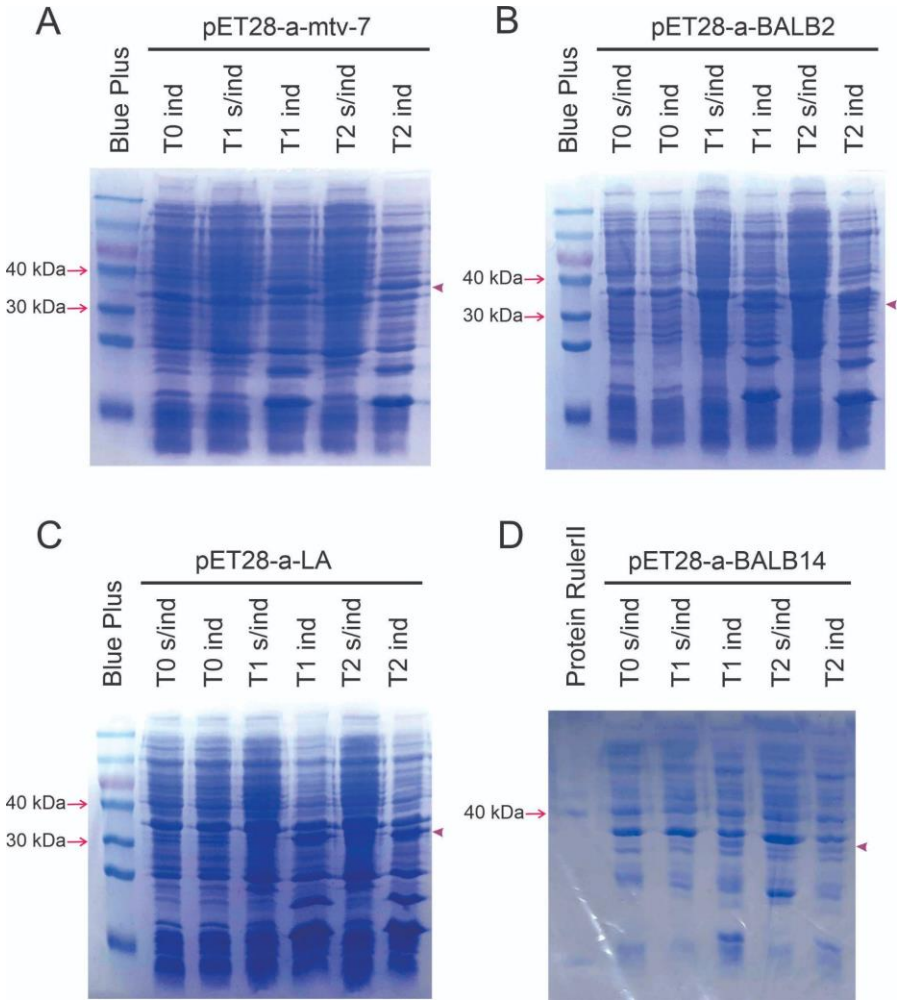


Figura 41. Ensayos de expresión a pequeña escala de las cuatro variantes de los SAgs de MMTV en condiciones estándar. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida 12% m/v desnaturalizantes utilizando lisados bacterianos. Para cada proteína se muestran los perfiles de expresión correspondientes a los tiempos: 0 horas, 2 horas (t1) y 4 horas (t2) para los cultivos sin inducir e inducidos tras el agregado de IPTG. **A. Expresión de la proteína mtv-7-HT. B. Expresión de la proteína BALB2-HT. C. Expresión de la proteína LA-HT. D. Expresión de la proteína BALB14-HT.**

Como se puede observar en la **Figura 41**, los tamaños predichos mediante el uso de herramientas bioinformáticas se condicen con lo observado en los geles, lo que confirmaría *a priori* que las bacterias no poseen los mecanismos necesarios para las modificaciones postraduccionales de glicosilación y posibles sitios de proteólisis que se reportaron en trabajos previos de otros grupos de investigación (Mottershead et al., 1995; Winslow et al., 1992). Al analizar en detalle se observa que hay dos variantes de los SAgs (BALB2 y BALB14) que demuestran ser más sensibles a la degradación ya que se observa la banda de expresión a las 2 horas, pero se pierde a las 4 horas (**Figuras 41B y 41D**). Por otro lado, los SAgs LA y mtv-7 demostraron ser más estables, manteniendo una expresión sostenida entre las 2 y 4 horas de

expresión (**Figuras 41A y C**). Además, en la **Figura 41D** se puede observar que la expresión de BALB14 es demasiado tenue, casi imperceptible.

Verificación de la identidad de los superantígenos expresados

Con la finalidad de confirmar que las bandas de sobreexpresión observadas se deben a los superantígenos, se llevó a cabo un *Western Blotting* utilizando un anticuerpo monoclonal contra el *tag* de histidina sobre lisados bacterianos inducidos y sin inducir, cuyos resultados se muestran en la **Figura 42**.

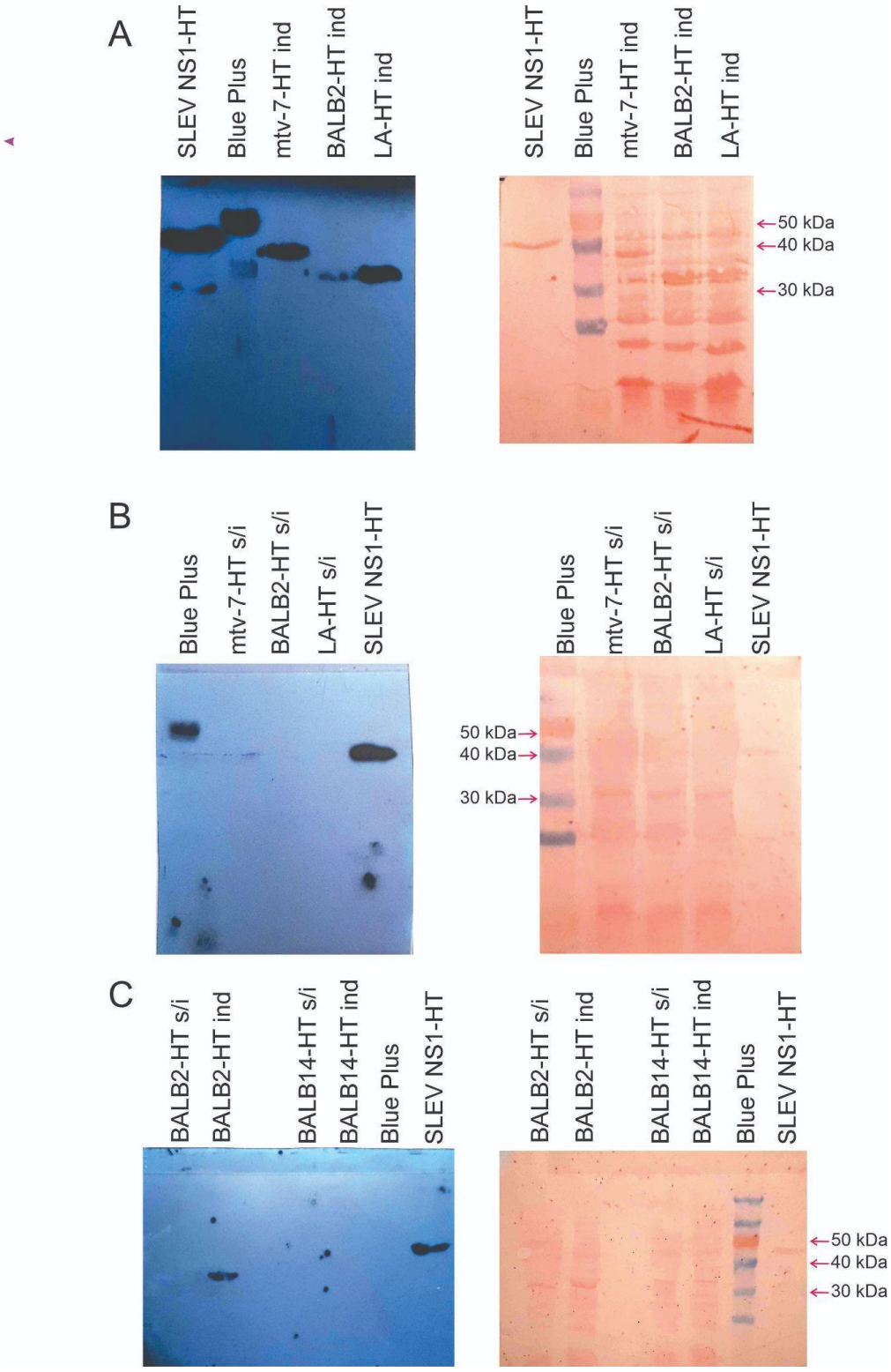


Figura 42. *Western Blotting* de los cultivos bacterianos expresando diversas versiones de los SAgs de MMTV. Los lisados celulares fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida 12% m/v y posteriormente transferidos a membranas de PVDF a las cuales se las sometió a inmunodetección con un anticuerpo monoclonal contra HisTag. En todos los casos se utilizó como control positivo la proteína NS1-HT de SLEV cuyo peso molecular es de aproximadamente 41 kDa (Lorch et al., 2019). **A. Inmunodetección de los lisados bacterianos tras inducción de la**

expresión. Izq: Placa radiográfica. Der: Membrana de PVDF teñida con Rojo Ponceau. **B. Inmunodetección de los lisados bacterianos sin inducción de la expresión.** Izq: Placa radiográfica. Der: Membrana de PVDF teñida con Rojo Ponceau. **C. Inmunodetección de los lisados bacterianos que expresan BALB14-HT.** Izq: Placa radiográfica. Der: Membrana de PVDF teñida con Rojo Ponceau.

En la **Figura 42A** se puede observar que efectivamente el anticuerpo logró detectar las fusiones proteicas a los pesos moleculares esperados en los cultivos inducidos con IPTG, mientras que eso no ocurrió en los cultivos sin inducir (**Figura 42B**). Mientras que para las muestras de mtv-7-HT y LA-HT la señal se observa robusta, en el caso de BALB2-HT la señal es débil. Eso probablemente se deba a la inestabilidad o degradación de la misma, ya que se utilizaron los lisados bacterianos correspondientes a 4 horas de expresión a 37°C, donde se pudo observar que disminuye la cantidad de la proteína en relación con las 2 horas (**Figura 42B**).

Con el objetivo de analizar si la inmunodetección de BALB2-HT mejoraba al utilizar los cultivos bacterianos tras 2 horas de expresión, se repitió el *Western Blot* (**Figura 42C**), sumando el homogenado de bacterias inducidas a las 4 horas de expresión a 37°C para BALB14-HT. Como se puede observar en dichas placas radiográficas, no se obtuvo inmunodetección del *tag* de histidinas en los cultivos que expresan BALB14-HT, lo que puede deberse a problemas en la expresión, ya que no fue posible identificar productos de sobreexpresión diferencial en el tamaño esperado (**Figura 41D**). Sumado a esto, en la oportunidad en la cual se realizó la detección de BALB14 podría haber problemas técnicos ya que se puede observar que el control positivo tiene una señal mucho más tenue que en las **Figuras 42A y B**.

Optimización de la expresión

Una vez confirmada que la expresión se debe a proteínas fusionadas al *tag* de histidinas, se intentó mejorar los rendimientos para avanzar en la purificación de las proteínas. Como se observa en la **Figura 41**, tanto BALB2 como BALB14 se degradan a las 4 hs de expresión, por lo se evaluó inducir la expresión de todos los superantígenos a una temperatura de 22°C.

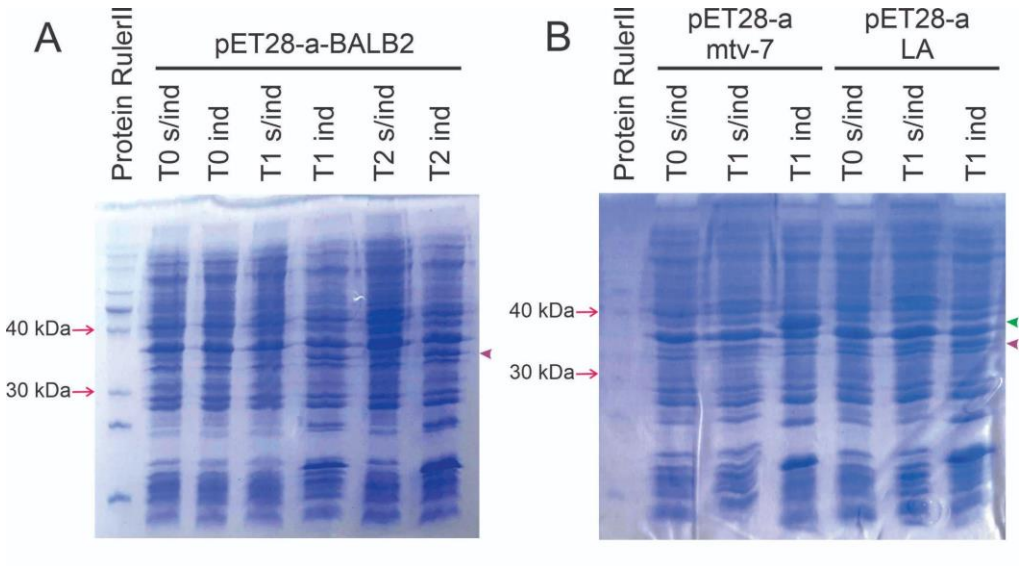


Figura 43. Expresión de los SAgs en sistemas bacterianos a 22°C. Se mantuvo la concentración final de IPTG a 1 mM, la agitación a 200 rpm y el tiempo de expresión a 2 y 4 horas post-inducción. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes 12% m/v de lisados bacterianos y posterior tinción con Coomasie Blue. **A. Expresión de BALB2-HT a 22°C.** En la calle número 1 se utilizó el marcador de peso molecular ProteinRuler II y en el resto de las calles se muestran las bacterias sin inducir o inducidas a distintos tiempos de expresión. **B. Expresión de mtv-7-HT y LA-HT a 22°C.** En la calle número 1 se utilizó el marcador de peso molecular ProteinRuler II y en el resto de las calles se muestran las bacterias sin inducir o inducidas a distintos tiempos de expresión.

Como se puede observar al comparar las **Figuras 41** y **43**, la expresión de los superantígenos fue mayor a 37°C que a 22°C, aunque en esta última prueba se obtuvo menor degradación de BALB2, y no se observaron diferencias para BALB14. En ese sentido, se decidió avanzar utilizando las expresiones a 37°C.

Análisis de la solubilidad de las proteínas

Para definir el protocolo de purificación de las proteínas expresadas, es necesario analizar la solubilidad de las mismas. Para ello, se procedió a lisar las bacterias mediante el uso de un sonicador de punta, y tras una centrifugación del lisado se separaron las fracciones de sobrenadante (fracción soluble) y precipitado (fracción insoluble) para determinar en cuál de ambas se encontraban las proteínas (**Figura 44**).

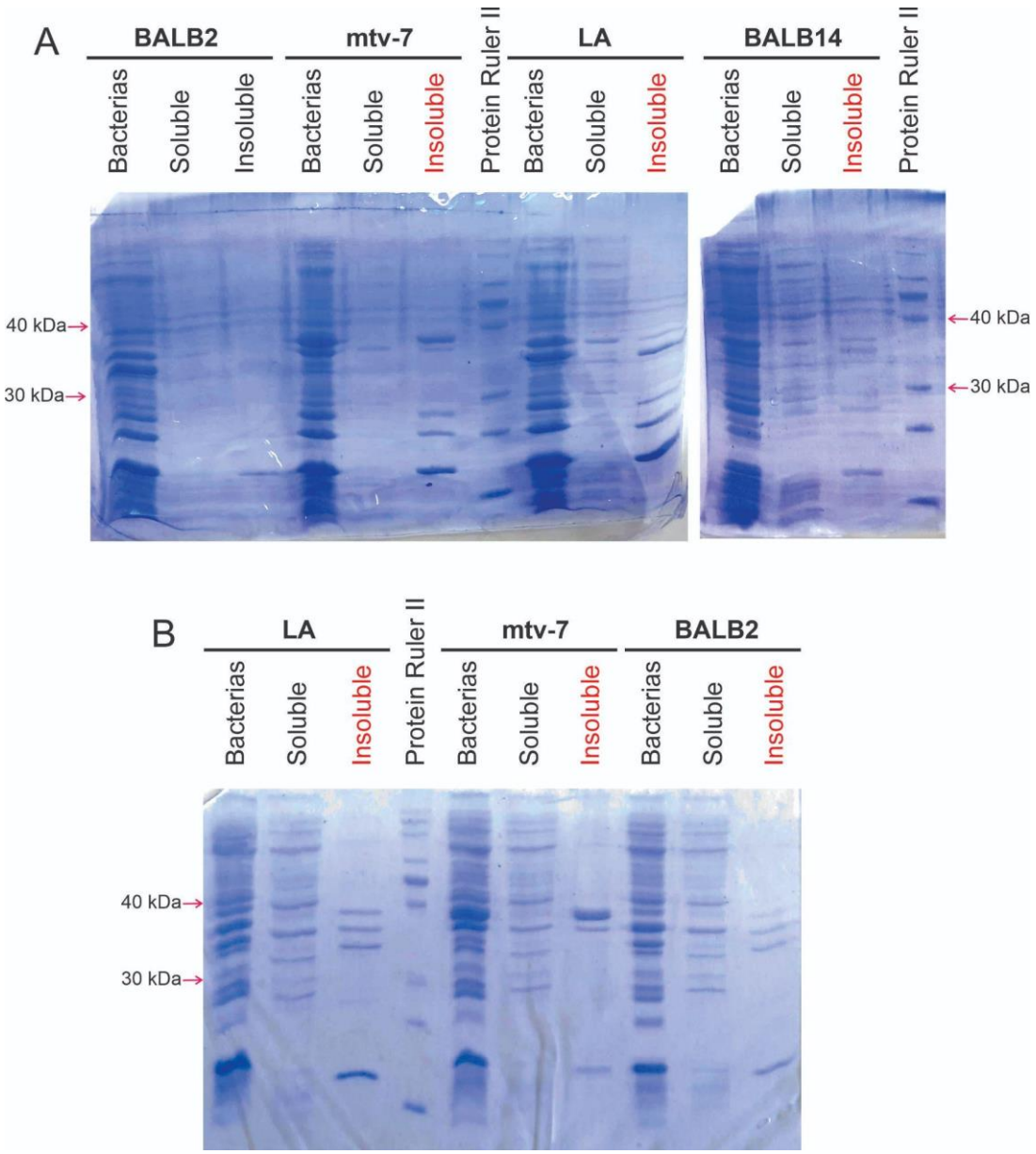


Figura 44. Análisis de la solubilidad de los SAgs producidos en sistemas bacterianos tras expresión a distintas temperaturas durante 4 horas. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes 12% m/v de lisados bacterianos y posterior tinción con Coomasie Blue. En todos los geles se utilizó el marcador de peso molecular ProteinRuler II y se señalan las bandas de peso molecular de interés para el análisis. **A. Análisis de la solubilidad de las proteínas expresadas a 37°C. B. Análisis de la solubilidad de las proteínas expresadas a 22°C.**

Al analizar la solubilidad de las fracciones proteicas obtenidas a partir de la expresión a 37°C, se observa que LA-HT, BALB14-HT y mtv-7-HT se localizan en la fase insoluble (**Figura 44A**). No fue posible determinar la distribución de BALB2-HT. De la misma forma, tras la expresión a 22°C durante 4 horas (**Figura 44B)**, puede verse que tanto LA-HT, como BALB2-HT y mtv-7-HT se encuentran en la fracción insoluble.

Las posteriores aplicaciones de estas proteínas requieren que las mismas se encuentren de forma soluble. Por ello, en el marco de una colaboración con el Dr. Alejo Gianotti del Laboratorio de Expresión y Plegado de Proteínas de la UNQ, se evaluó la solubilidad en *buffer* de lisis con agregados de trehalosa a una concentración final de 0.75 M, ya que hay trabajos que demostraron que el agregado de determinados componentes puede mejorar la solubilidad de diversas proteínas (Leibly et al., 2012). Para llevar adelante este ensayo, se seleccionó la proteína mtv-7-HT, y se evaluó el efecto de la temperatura en la solubilidad. Las condiciones ensayadas fueron: sin inducir, inducido a 37°C durante 2 horas e inducción a 22°C durante 2 horas. En todos los casos se agregó trehalosa al *buffer* de lisis. Además, se decidió analizar la solubilidad en presencia y ausencia de trehalosa expresando a 16°C, resultados que se muestran en la **Figura 45**.

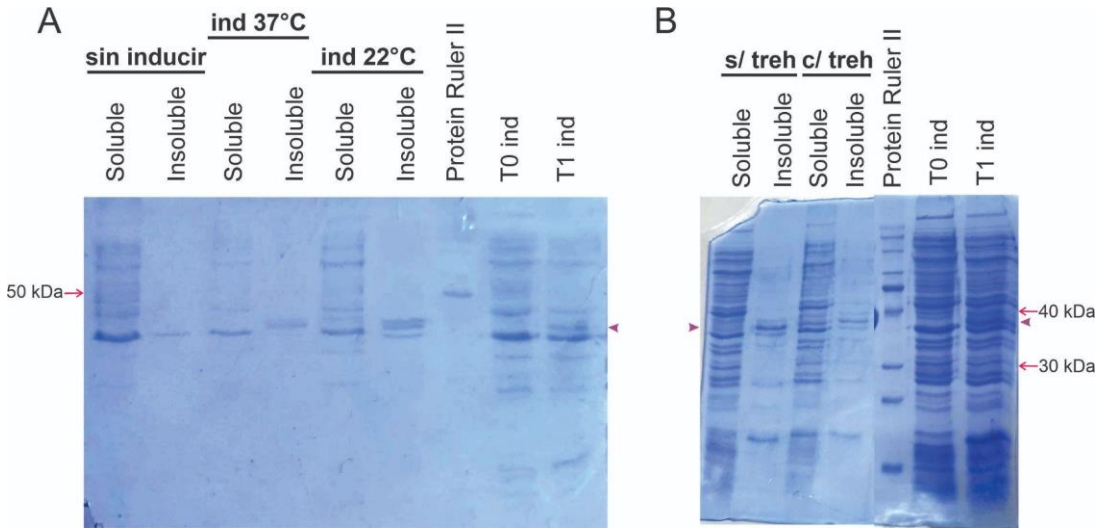


Figura 45. Optimización de la solubilidad de mtv-7-HT. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante 12% m/v de lisados bacterianos y posterior tinción con Coomasie Blue**.** Como referencia del peso molecular se utilizó el marcador ProteinRulerII. **A. Efecto de la temperatura y el agregado de trehalosa sobre la solubilidad.** Se muestran las fracciones solubles e insolubles tras lisis y centrifugación de cultivos de *E. coli* Rosetta expresando mtv-7-HT sin inducción, cuya inducción se realizó a 37°C y con inducción a 22°C. A la derecha se muestran los lisados de bacterias en tiempo 0 y tiempo 1 de expresión (2 horas a 37°C). La flecha violeta muestra la altura en la cual se espera la banda proteica correspondiente a mtv-7-HT. **B. Solubilidad de mtv-7-HT tras expresión a 16°C en presencia y ausencia de trehalosa.** Se muestran las fracciones solubles e insolubles tras lisis y centrifugación de cultivos de *E. coli Rosetta* expresando mtv-7-HT y lisando en *buffer* sin trehalosa y *buffer* con trehalosa, cuya inducción se realizó a 16°C. Además, a la derecha se muestran los lisados de bacteria sin inducir y con inducción tras agregado de IPTG.

Como se puede observar en la **Figura 45A,** al inducir la expresión de mtv-7-HT a 37°C, la misma se encuentra posteriormente en la fracción insoluble. Al observar la expresión

a 22°C es posible identificar una banda en la fracción soluble, con lo que podría pensarse que hay una pequeña fracción que se solubiliza.

En la **Figura 45B** se observa una banda compatible con mtv-7-HT en la fracción soluble al lisar con un *buffer* que contenía trehalosa. Es por ello que se decidió considerar la posibilidad de hallar al menos una pequeña fracción soluble de dicha proteína al expresarla a 16°C. Sin embargo, al comparar las tres temperaturas de expresión (37°C, 22°C y 16°C), se consideró que el rendimiento tras la expresión a 16°C es muy bajo. En base a ello, se procedió a realizar la expresión a 37°C, solubilizar con urea y realizar la purificación en condiciones desnaturalizantes.

Expresión a mediana escala y purificación

Con la finalidad de purificar mtv-7-HT, se inocularon 250 mL de medio LB con cloranfenicol y kanamicina con bacterias *E. coli Rosetta* portando el plásmido pET-28-a-mtv7 y se indujo la expresión a una DO_{600} de 0,640, 37°C, 200 rpm, IPTG 1mM y durante 2 horas. Posteriormente, los precipitados bacterianos fueron resuspendidos en *buffer* de lisis sin trehalosa, se purificaron y rompieron los cuerpos de inclusión siguiendo el protocolo que se muestra en **Materiales y Métodos**. Luego, se resuspendieron los *pellets* con *buffer* A que posee urea 8M y se separó la fracción soluble mediante centrifugación.

La purificación se llevó a cabo mediante el uso de una columna de Níquel (HisTrap, Cytiva) y de manera manual. Luego de inyectar la muestra, se lavó inicialmente con un *buffer* sin imidazol y luego con un *buffer* que tenía una pequeña cantidad de imidazol. Finalmente, se eluyó en 10 mL de *buffer* con Imidazol 0.25M y las alícuotas se colectaron de un volumen final de 0,5 mL cada una. Las fracciones fueron almacenadas a -80°C hasta su uso y se verificó su composición mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (**Figura 46**). Posteriormente se avanzó en realizar diálisis mediante dos metodologías diferentes con la finalidad de eliminar la urea y el imidazol. Para ello se unificaron las fracciones 14, 21 y 22 colocándolas en un caramelo realizado con una membrana de diálisis de un valor de corte de 14 kDa sumergido en *buffer* de diálisis. Se llevó a cabo durante toda la noche a 4°C en agitación. Al día siguiente se cambió el *buffer* por líquido fresco y se dejó 4 horas más de diálisis a 4°C en agitación. Por otra parte, se evaluó el efecto del pH en la solubilidad de las fracciones purificadas, resultados que se muestran debajo.

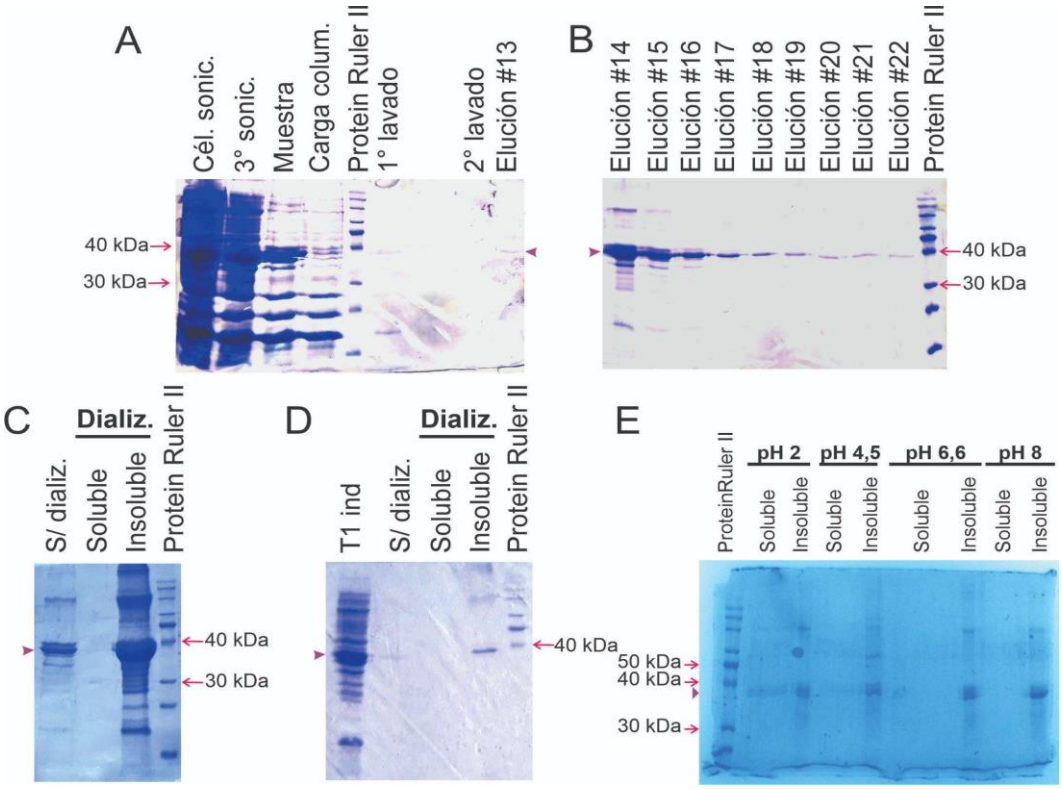


Figura 46. Purificación de mtv-7-HT mediante cromatografía de pseudoafinidad. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante 12% m/v de las distintas fracciones purificadas y posterior tinción con Coomasie Blue. **A. Fracciones obtenidas durante la última ronda de sonicado, los lavados de columna y la primera elución.** En la calle número 5 se utilizó el marcador de peso molecular ProteinRulerII y a su izquierda se muestran las fracciones previas a los lavados y la elución. A la derecha se muestran las fracciones del primer y segundo lavado de la columna, así como la primera fracción de elución. La flecha violeta muestra la altura en la cual se espera la banda proteica correspondiente a mtv-7-HT. **B. Fracciones obtenidas durante la elución.** En la calle número 10 se utilizó el marcador de peso molecular ProteinRulerII y a su izquierda se muestran todas las fracciones de elución. La flecha violeta muestra la altura en la cual se espera la banda proteica correspondiente a mtv-7-HT. **C. Diálisis en dos pasos de las fracciones purificadas de mtv-7-HT.** De izquierda a derecha: se muestran las fracciones sin dializar, y las fracciones solubles e insolubles de la muestra dializada. En la calle número 4 se utilizó el marcador de peso molecular ProteinRulerII**.** La flecha violeta muestra la altura en la cual se espera la banda proteica correspondiente a mtv-7-HT. **D. Diálisis escalonada de 6 pasos.** De izquierda a derecha: se muestra el lisado de bacterias expresando la proteína, la fracción sin dializar, y las fracciones solubles e insolubles de la muestra dializada. En la calle número 5 se utilizó el marcador de peso molecular ProteinRulerII**.** La flecha violeta muestra la altura en la cual se espera la banda proteica correspondiente a mtv-7-HT. **E. Efecto del pH en la solubilidad de mtv-7-HT**. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante 12% m/v de una misma fracción de mtv-7-HT purificada tras dilución 1/10 con *buffers* de distintos pH. El gel luego de la electroforesis fue teñido con Coomasie Blue. En la primera calle se utilizó el marcador de peso

molecular ProteinRulerII. La flecha violeta muestra la altura en la cual se espera la banda proteica correspondiente a mtv-7-HT.

Como se puede observar en la **Figura 46A**, puede que se pierda parte de mtv-7-HT en la carga de la columna. También se observa una banda que podría corresponderse con mtv-7-HT en la fracción analizada correspondiente al 1° lavado, mientras que no se observa en el 2° lavado de la columna. Asimismo, la primera fracción de elución (alícuota #13) posee muy poca cantidad de la proteína y por lo tanto no debería utilizarse ya que probablemente se corresponda con el volumen muerto de lo restante del 2° lavado. Por otro lado, al analizar la **Figura 46B** se puede observar en principio que se pudo lograr la purificación de la proteína mediante cromatografía de pseudoafinidad, observando que las fracciones 14 a 22 son positivas, con diferentes grados de pureza. No sería recomendable utilizar las fracciones 14 o 15 porque tienen contaminación con otros componentes, mientras que el resto de las fracciones se encuentran más puras, aunque con menor concentración de la proteína. En tal caso, dichas fracciones podrían volver a someterse al proceso de purificación.

Como se observa en la **Figura 46C,** al realizar el protocolo de diálisis en dos pasos, la totalidad de la proteína se volvió insoluble. Por lo que se intentó un protocolo de diálisis escalonada de 6 pasos, cuyos resultados se muestran en la **Figura 46D**. El protocolo más prolongado tampoco logró obtener la proteína en su forma soluble.

En este punto, retomamos la colaboración con el LEPP de la UNQ, pero en esta oportunidad con la Dra. Pamela Toledo, y se propuso el abordaje de 2 alternativas para obtener las proteínas solubles. En primera instancia el objetivo fue analizar si la solubilidad de la proteína variaba en función del pH del medio, labor que se realizó en conjunto con la est. Ornella Flores. Para ello, se realizaron diluciones 1/10 de una de las fracciones de proteína purificada utilizando *buffers* de pH 2, pH 4.5 y pH 10. Luego se llevó a cabo una centrifugación para separar las fracciones solubles e insolubles y las fracciones solubles fueron precipitadas con ATC para obtener un resultado observable en geles de poliacrilamida.

Como se puede observar en la **Figura 46E**, se encontró un aumento en la solubilidad de la proteína al diluir con un *buffer* de pH 2, en comparación con los *buffers* utilizados habitualmente como rutina en los protocolos de purificación. Sin embargo, la posibilidad de utilizar *buffers* a dicho pH y además mantener dicha condición será imposible en las condiciones de los ensayos biológicos ya que las células se cultivan en medios de cultivo cuyo pH es alrededor de 7.4. En ese sentido, tras el agregado de los µL correspondientes a la proteína como estímulo en los pocillos con células, probablemente el pH cambie a un pH más alto y como consecuencia la proteína se vuelva insoluble nuevamente.

Por otro lado, otra de las propuestas por parte de la Dra. Pamela Toledo fue evitar el agregado de DTT a los *buffers* para evitar romper los puentes disulfuro que tal vez se encuentren involucrados en asegurar el correcto plegamiento de las proteínas. Como consecuencia de un plegamiento incorrecto, podría ocurrir que al retirar la urea las proteínas no puedan recuperar su estructura y se volverían insolubles.

Tras dichos resultados, nos propusimos volver a indagar sobre las condiciones de expresión y su impacto en la solubilidad, por lo que se realizó una prueba de expresión de mtv-7-HT a 16°C durante toda la noche. En ese caso, las condiciones de expresión fueron las que se indican previamente, pero al ser un ensayo *overnight*, la concentración de IPTG fue de 0,5 mM. Los resultados de dicho experimento se muestran en la **Figura 47.**

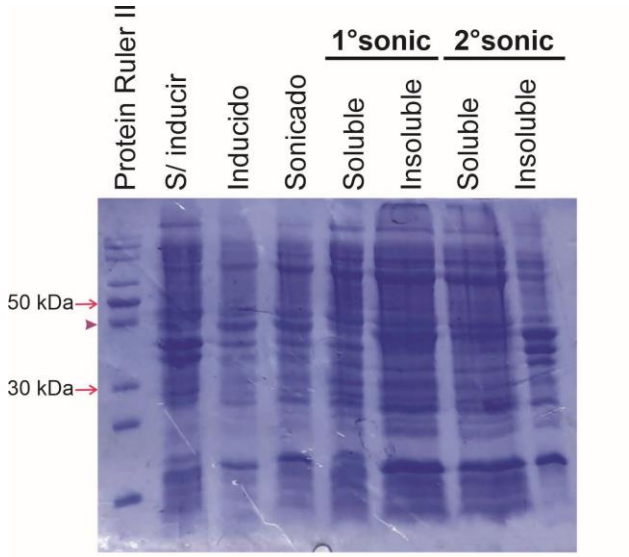


Figura 47. Solubilidad de mtv-7-HT tras expresión a 16°C durante toda la noche. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante 12% m/v de los distintos lisados bacterianos, tras posterior tinción con Coomasie Blue. En la primera calle se utilizó el marcador de peso molecular ProteinRulerII**.** De izquierda a derecha se muestran: bacterias sin inducir, bacterias con inducción de la expresión, sonicado de las bacterias inducidas y las fracciones solubles e insolubles de la primera y segunda ronda de sonicado. El segundo ciclo de sonicado se realizó resuspendiendo la fracción insoluble en un *buffer* que contenía UREA 8M. La flecha violeta muestra la altura en la cual se espera la banda proteica correspondiente a mtv-7-HT.

Como se puede observar en la **Figura 47**, hay una leve señal de una proteína en el tamaño esperado en las fracciones solubles, tanto en el primer ciclo de sonicado como en el segundo. Dicha observación causó que se avance en la purificación de la proteína siguiendo el mismo protocolo que utilizado previamente, pero no pudo observarse ninguna proteína en las fracciones de elución (datos no mostrados). Es por ello que lo observado en la **Figura 47** podría deberse a otra proteína o algún artefacto, pero probablemente no haya mtv-7-HT en la fase soluble.

Considerando que mtv-7 era la más problemática de las 4, se comenzaron a repetir algunos de los procedimientos con otras proteínas, especialmente con BALB2 que se encontró que se degradaba a 4 horas de expresión a 37°C y era particularmente de nuestro interés por una colaboración que involucraba su uso, cuyos detalles de abordarán en el **Capítulo VI** de la presente tesis. En este sentido, se llevó a cabo un ensayo de expresión a 16°C y se evaluó la expresión a 2 y 4 horas, cuyos resultados se muestran en la **Figura 48**.

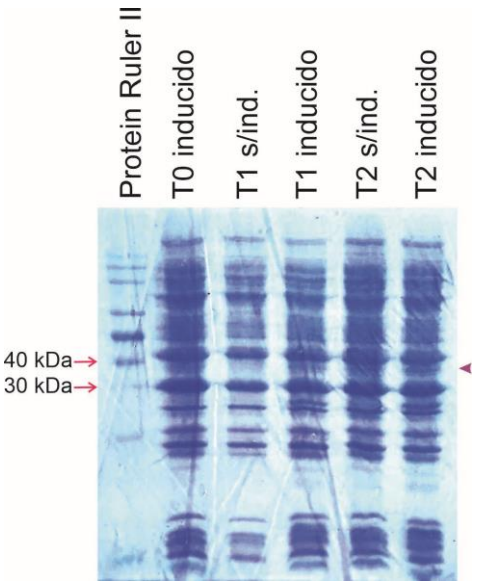


Figura 48. Expresión de BALB-2-HT a 16°C. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante 12% m/v de los distintos lisados bacterianos, tras posterior tinción con Coomasie Blue. En la primera calle se utilizó el marcador de peso molecular ProteinRulerII**.** De izquierda a derecha se muestran: bacterias en tiempo cero de expresión, bacterias sin inducir a tiempo 2 horas, bacterias con inducción de la expresión a tiempo 2 horas, bacterias sin inducir a tiempo 4 horas y bacterias inducidas a tiempo 4 horas. La flecha violeta muestra la altura en la cual se espera la banda proteica correspondiente a BALB2-HT.

Como se puede observar en la **Figura 48**, hay una pequeña expresión de BALB2-HT a esta temperatura, que incluso se mantiene a las 4 horas de expresión. En este sentido, resulta evidente que para obtener una buena masa de proteína es conveniente llevar a cabo la expresión a 37°C durante 2 horas. Por cuestión de tiempos no se llegó a realizar el escalado de la producción y purificación de BALB2-HT, pero es una de las actividades pautadas para el seminario de grado de la Est. Ornella Flores. Sumado a esto, también se propuso avanzar en la producción y purificación de LA-HT y BALB14-HT en el marco de dicho seminario de grado.

Expresión de SAgs en células de mamífero

En forma paralela a la producción y purificación de los SAgs-HT en sistemas bacterianos, se utilizaron los plásmidos pZ-SAgs para la vehiculización de los cuatro SAgs virales seleccionados en VLPs derivadas de la proteína Z de JUNV. Los plásmidos poseen

los elementos para permitir la expresión de los marcos abiertos de lectura en células eucariotas tales como el promotor de CMV y la señal de poliadenilación SV40. Dado que el sistema de producción de VLPs basado en Z de JUNV se encuentra bien caracterizado utilizando células HEK293T, se utilizó dicha línea celular.

Análisis bioinformáticos

Una vez obtenidas las secuencias de las construcciones plásmidicas pZ-SAgs, se utilizaron herramientas bioinformáticas para determinar algunas características de las proteínas de fusión Z-SAgs, cuyos resultados se muestran en la **Tabla 25**.

Proteína	Peso molecular	Cantidad de aminoácidos	pI	Ubicación intracelular
Z-BALB2	43 kDa	378	9.39	Nt fuera de las células, 0 hélices TM
Z-BALB14	43,4 kDa	383	9.36	Nt fuera de las células, 0 hélices TM
Z-LA	43,7 kDa	385	9.17	Nt fuera de las células, 0 hélices TM
Z-mtv-7	47,9 kDa	422	9.32	Nt fuera de las células, 0 hélices TM

Tabla 25. Resumen de las predicciones bioinformáticas de las proteínas de fusión Z-SAgs. Las primeras 3 columnas fueron determinadas utilizando la herramienta ProtParam, mientras que la presencia de dominios transmembrana fue predicha mediante el uso de HMMTOP.

Como se puede observar en la **Tabla 25**, las proteínas Z-SAgs son muy similares entre sí, exceptuando a Z-mtv-7 que posee mayor tamaño que el resto. Por fuera de eso, su punto isoeléctrico es similar y la ubicación intracelular predicha también. En este caso, la ausencia de hélices transmembrana es muy importante para la estrategia de vehiculización, ya que si parte de las proteínas se encontrase fuera de las vesículas podría ser degradada por la proteinasa K y por lo tanto las VLPs carecerían del componente activo total o parcialmente. El uso de proteinasa K es parte del procedimiento estandarizado para la purificación de las $VLPs_Z$, cuyos detalles se muestran en la **Sección II**, página 50.

Ensayos de expresión en monocapas celulares eucariotas

A continuación, se procedió a realizar una prueba de expresión con células HEK293T para la producción de las VLPs con las fusiones proteicas Z-SAgs en su cara interna. Para ello se utilizaron monocapas celulares a una confluencia de 60% aproximadamente, en una placa de 6 pocillos y se transfectaron con PEI87K en conjunto con las construcciones pZ-BALB2 #10, pZ-LA #10 y pZ-mtv7 #4. Como control un pocillo fue rotulado como *Mock* en el cual no se colocó material genético, pero si el resto de los reactivos, y como control positivo se utilizó el plásmido pZ-eGFP que induce expresión fluorescente verde del cultivo. La

transfección fue transitoria y luego de 48 horas se recolectaron las fracciones celulares, que fueron posteriormente utilizadas para realizar un *Western Blotting* utilizando un anticuerpo policlonal contra la proteína Z de JUNV, cuyos resultados se muestran en la **Figura 49**.

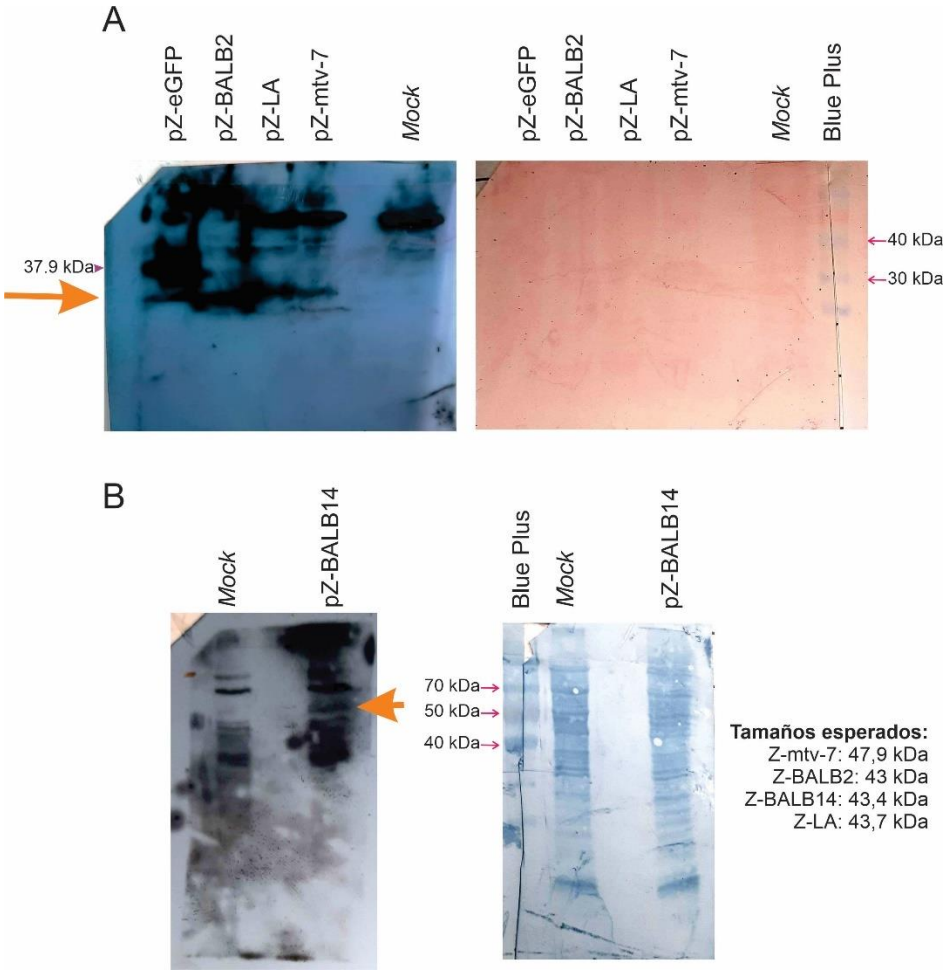


Figura 49. *Western Blotting* de las monocapas transfectadas utilizando un anticuerpo anti Z JUNV. A. Inmunodetección de monocapas celulares transfectadas con diversas construcciones. De izquierda a derecha se muestran las monocapas celulares transfectadas con los plásmidos: pZ-eGFP, pZ-BALB2, pZ-LA y pZ-Mtv-7, el control negativo y el marcador de peso molecular BluePlus. La flecha violeta muestra el tamaño de la proteína de fusión Z-eGFP cuyo tamaño aproximado es de 37.9 kDa. Se detallan los tamaños esperados para cada proteína de fusión, predichos con el uso de herramientas bioinformáticas. Las flechas naranjas indican las bandas de interés para el análisis. Izq: Placa radiográfica. Der: Membrana de PVDF teñida con Rojo Ponceau. **B. Inmunodetección de monocapas celulares transfectadas con pZ-BALB14.** Izq: Placa radiográfica. Der: Membrana de PVDF teñida con Amido Black.

Al analizar la **Figura 49**, se puede observar en principio que hay inmunodetección en todas las calles donde hay muestra, a distintos tamaños. En este sentido, al utilizar un anticuerpo policlonal realizado en conejos, el pegado en la región superior de la membrana podría ser inespecífico. De hecho, se observa una señal positiva en la calle correspondiente

al *Mock*, estableciendo el *background* de la técnica y por lo tanto las bandas proteicas positivas serían las de peso molecular inferior a las que muestra el *Mock* (señaladas con la flecha naranja). En la **Figura 49A** se puede confirmar la detección de la fusión proteica Z-eGFP que es el control positivo, así como algunas variantes proteicas derivadas de la misma a menor tamaño. Por otro lado, se logró detectar la presencia de Z en fusiones proteicas en las monocapas celulares transfectadas tanto con pZ-BALB2, pZ-LA cómo con pZ-mtv-7. En este sentido, se puede confirmar que los plásmidos pZ-SAgs transfectados son capaces de inducir la expresión de proteínas de fusión que portan Z y cuyos pesos moleculares son menores a 40 kDa.

Se observó que las proteínas Z-SAgs poseen menor peso molecular que el predicho bioinformáticamente. Este hecho tiene sentido, ya que las células HEK293T son capaces de causar modificaciones postraduccionales a las proteínas como no lo hacen los sistemas bacterianos. Más aún, al analizar la estructura general de los SAgs de MMTV, se puede observar que posee al menos 2 sitios de reconocimiento de proteasas, como el sitio RKRR que es reconocido por la proteasa furina y RARR que también cumple los requerimientos para el reclutamiento de dicha proteasa. La posible modificación postraduccional de los SAgs expresados en el sistema utilizado podría causar una alteración de su peso molecular.

En la **Figura 49B** se puede observar que el anticuerpo anti Z no fue capaz de detectar una fusión proteica en el tamaño esperado para pZ-BALB14. Si bien se puede observar una banda diferencial en la muestra de monocapa celular transfectada con pZ-BALB14, a la altura aproximada entre 50 kDa y 70 kDa, no es del tamaño esperado.

Con respecto a las limitaciones de la técnica utilizada, lo ideal sería contar con la detección de las dos partes que conforman una proteína de fusión. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, hasta el momento no se han logrado purificar los SAgs de MMTV como subunidad, por lo que no se cuenta con anticuerpos monoclonales disponibles comercialmente. Si bien en nuestro laboratorio contamos con anticuerpos contra MMTV, dado que los SAgs no son proteínas estructurales del virión, no se han podido utilizar en ensayos de *Western Blotting*.

Producción y purificación de VLPs$_{Z\text{-}SAgs}$

Para poder obtener más información al respecto del sistema de expresión, se avanzó en la producción de lotes individuales de cada una de las VLPs. Para ello se transfectaron frascos T75 con células HEK293T con confluencia media, utilizando PEI con los plásmidos correspondientes. Luego de 48 horas de expresión se comenzaron a recolectar los sobrenadantes de cultivo, reemplazándolo con medio fresco DMEM 2%SFB, repitiendo durante 5 a 7 días. Los sobrenadantes de cultivo fueron clarificados y ultracentrifugados en

colchones de sacarosa 30% m/v durante 2 horas a 4°C y 96000*xg*. Posteriormente se llevó a cabo un tratamiento con proteinasa K y a continuación se realizó un último paso de ultracentrifugación. El tratamiento con proteinasa K es rutinario y tiene el objetivo de eliminar restos de VLPs defectuosas, BSA remanente y proteínas contaminantes que puedan co-purificar con las VLPs intactas. Dado que la fusión proteica se encuentra en la cara interna de las partículas, la proteinasa K no es capaz de degradar las proteínas vehiculizadas.

Inicialmente se comenzó produciendo las $VLPs_{Z\text{-}mtv7}$ y los controles de dicho lote se muestran en la **Figura 50**.

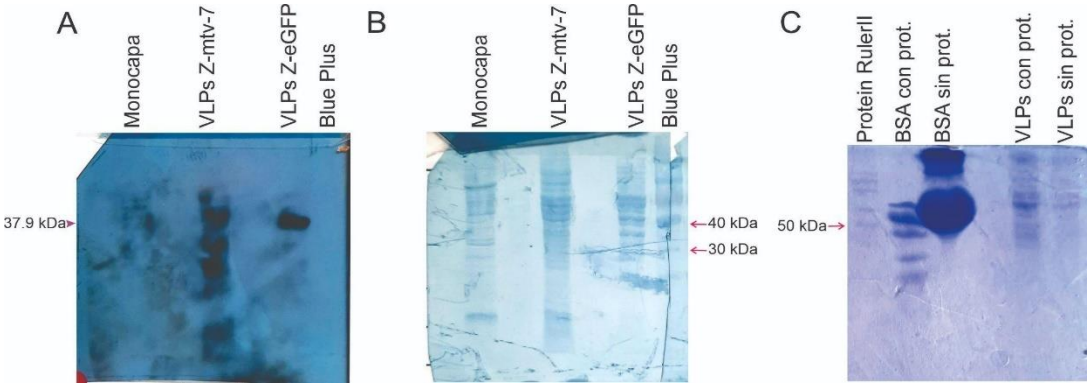


Figura 50. Caracterización del lote de $VLPs_{Z\text{-}mtv\text{-}7}$. A. *Western Blotting*: Placa radiográfica. Se muestran las calles correspondientes a: la monocapa celular transfectada con el plásmido pZ-Mtv-7, la fracción de VLPs purificadas Z-mtv-7, las VLPs control purificadas (pZ-eGFP) y el marcador de peso molecular BluePlus. La flecha violeta muestra el tamaño de la proteína de fusión Z-eGFP cuyo tamaño aproximado es de 37.9 kDa. **B. *Western Blotting:* Membrana de PVDF teñida con Amido Black. C. Evaluación de la acción de la proteinasa K en fracciones de $VLPs_{Z\text{-}mtv7}$**. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida desnaturalizante 12% m/v en el cual se evaluaron diversas muestras. El detalle de las calles de izquierda a derecha es: marcador de peso molecular ProteinRulerII, BSA tratada con proteinasa K, BSA sin proteinasa K, VLPs con proteinasa K, VLPs sin proteinasa K.

Como se observa en la **Figura 50A**, las $VLPs_{Z\text{-}mtv7}$ muestran un perfil de múltiples bandas (degradación), contrastando con la banda discreta revelada para el control positivo ($VLPs_{Z\text{-}eGFP}$). Asimismo, se puede observar que la banda proteica de menor peso molecular detectada en la placa radiográfica en la calle correspondiente a Z-mtv7 podría ser Z en su forma soluble, que tiene un peso molecular aproximado de 14 kDa. Por otro lado, la fracción de la monocapa celular demostró muy baja señal de detección de la proteína de fusión. Asimismo, en la electroforesis de proteínas en la **Figura 50C** se puede comprobar que la proteinasa K funcionó correctamente. Una vez que se logró exitosamente la purificación del primer lote de $VLPs_{Z\text{-}mtv7}$, nos propusimos avanzar en la producción del resto de las $VLPs_{Z\text{-}SAgs}$. En esta nueva producción, se transfectó 1 frasco T175 por cada construcción (pZ-BALB2,

pZ-BALB14, pZ-LA, pZ-mtv-7 y pZ-eGFP como control). Los resultados de este nuevo lote de producción de VLPs se muestran en la **Figura 51**.

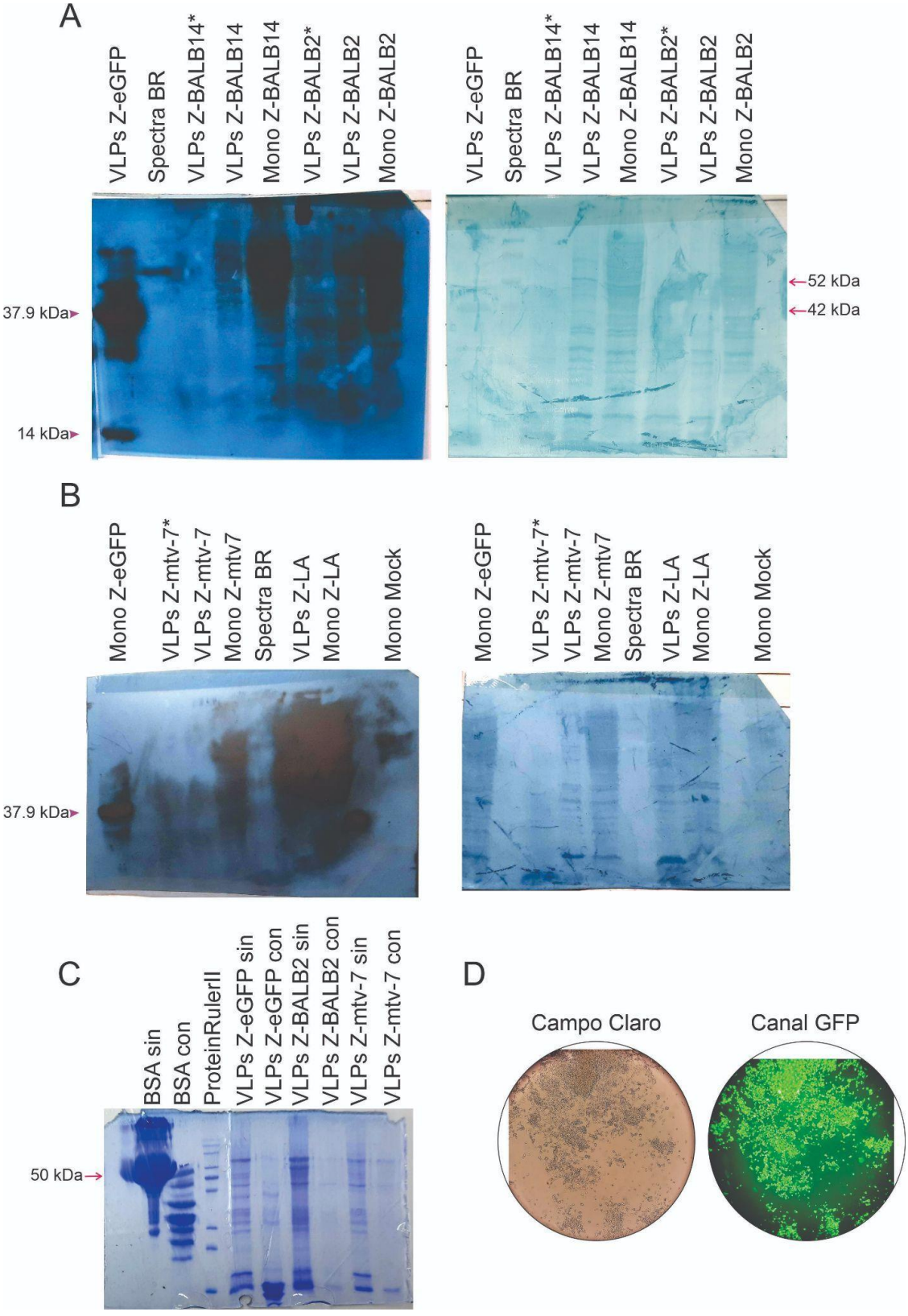


Figura 51. Caracterización del segundo lote de VLPs$_{Z\text{-}SAgs}$. Las fracciones que tienen un * detrás de su nombre se corresponden con las tratadas con proteinasa K. **A. *Western Blotting* de algunas fracciones.** A la izquierda se muestra la placa radiográfica y a la derecha, la membrana de PVDF teñida con *amido black*. Las flechas violetas muestran el tamaño de la proteína de fusión Z-eGFP cuyo

tamaño aproximado es de 37.9 kDa y de la proteína Z como subunidad, cuyo tamaño es 14 kDa. **B. *Western Blotting* del resto de las fracciones.** A la izquierda se muestra la placa radiográfica y a la derecha, la membrana de PVDF teñida con amido black. La flecha violeta muestra el tamaño de la proteína de fusión Z-eGFP cuyo tamaño aproximado es de 37.9 kDa. **C. Evaluación de la acción de la proteinasa K en fracciones de las VLPs**. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida desnaturalizante 12% m/v en el cual se evaluaron diversas muestras y posteriormente se llevó a cabo una tinción con Coomasie Blue. **D. Microscopía de fluorescencia de monocapas transfectadas con pZ-eGFP.** Los frascos fueron analizados utilizando un Microscopio de Fluorescencia Digital Leica, utilizando el objetivo 10X y del mismo campo de células.

Como control de transfección se verificó la presencia de fluorescencia verde del cultivo transfectado con pZ-eGFP a las 72 horas post-transfección (**Figura 51D**). Los sobrenadantes de cultivo recolectados fueron clarificados y ultracentrifugados como se mencionó anteriormente. Luego del tratamiento con proteinasa K se procedió a ultracentrifugar nuevamente y a realizar los controles correspondientes, cuyos resultados se muestran en las **Figuras 51A, 51B y 51C.** Al analizar la **Figura 51C** se observa que la proteinasa K funcionó correctamente, pero lamentablemente las VLPs tratadas quedaron bastante diluidas en comparación con las sin tratamiento.

Al analizar la **Figura 51A** se puede concluir que no hay inmunodetección en la fracción de las $VLPs_{Z\text{-}BALB14}$ tratadas con proteinasa K, probablemente causado por dicha limpieza ya que la fracción no tratada fue reconocida con el anticuerpo anti Z. En segundo lugar, se puede observar que hubo inmunodetección en todas las fracciones correspondientes a la construcción Z-BALB2, incluso en las $VLPs_{Z\text{-}BALB2}$ tratadas con proteinasa K. Se consideró un lote válido basándose en la inmunodetección tanto de la fusión proteica Z-eGFP como de Z sola, en la primera calle del WB.

Cuando se observan los resultados que se muestran en la **Figura 51B** se puede concluir en principio que hubo problemas técnicos, de bloqueo y/o de transferencia. Esto puede comprobarse por el extraño patrón de proteínas que muestra el control positivo, ya que las monocapas transfectadas suelen demostrar señal positiva a tamaños altos y este no fue el caso. Por otro lado, dicho ensayo fue suficiente como para descartar los lotes de las $VLPs_{Z\text{-}mtv\text{-}7}$ ya que no se pudo detectar la fusión proteica. Con respecto a las $VLPs_{Z\text{-}LA}$ se pudo validar el lote producido, ya que se observa inmunodetección en la fracción de las VLPs, aunque un tamaño más alto del esperado en función de los primeros ensayos de expresión en células HEK293T.

Sumado a los análisis previos resulta interesante que el peso molecular de las fusiones proteicas se encuentra relativamente cercano al predicho mediante el uso de herramientas bioinformáticas y no se observa mucha degradación de las mismas, e incluso

puede encontrarse a la proteína Z en su forma libre (14 kDa). Esto pone en discusión si efectivamente hay o no modificaciones postraduccionales en el sistema de expresión utilizado e incluso por qué afectaría solo a mtv-7 si todas las secuencias de SAgs poseen el dominio RKRR. Un problema observado es que algunos de los lotes producidos no fueron capaces de atravesar los controles requeridos para poder ser utilizados en ensayos de actividad biológica y debajo se resume el estado de cada uno:

- $VLPs_{Z\text{-}BALB2}$: se pudo detectar la fusión proteica Z-BALB2 por lo que se considera un lote válido.

- $VLPs_{Z\text{-}BALB14}$: las VLPs tratadas no fueron inmunodetectadas utilizando el anticuerpos anti Z a pesar que las VLPs no tratadas y la monocapa muestran las fusiones esperadas.

- $VLPs_{Z\text{-}mtv7}$: no se pudo detectar correctamente la fusión proteica en las VLPs tratadas, pero se observa una correcta expresión en la monocapa transfectada. El lote no fue utilizado para ensayos posteriores tras considerarse inválido.

- $VLPs_{Z\text{-}LA}$: por problemas técnicos sólo se pudo obtener la fracción previa al tratamiento con proteinasa k. Se pudo detectar la fusión proteica en dicha muestra por lo que se utilizó para ensayos posteriores.

- $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$: se pudo detectar la fusión proteica Z-eGFP por lo que se avanzó en su uso como control en ensayos posteriores.

Como muchas de las variantes de las VLPs resultaron inválidas, se realizaron nuevos lotes de los mismos, utilizando 1 o 2 frascos T75 por cada construcción. El procedimiento realizado fue el mismo para la purificación de las VLPs, y las fracciones fueron analizadas mediante *Western Blotting*, como se muestra en la **Figura 52**.

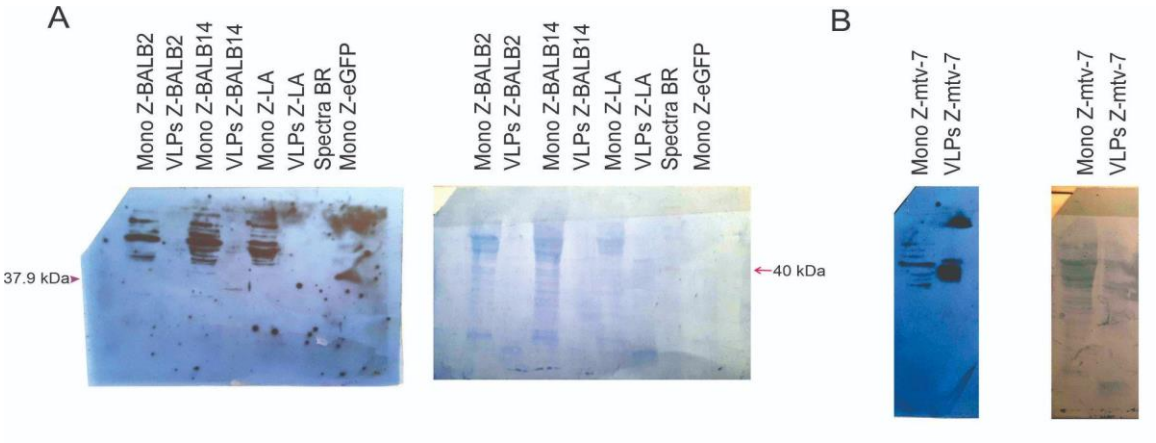


Figura 52. Caracterización del tercer lote de VLPs$_{Z\text{-}SAgs}$. A. *Western Blotting* de algunas fracciones. A la izquierda se muestra la placa radiográfica y a la derecha, la membrana de PVDF teñida con amido black. La flecha violeta muestra el tamaño de la proteína de fusión Z-eGFP cuyo tamaño aproximado es de 37.9 kDa. **B. *Western Blotting* de las VLPs$_{Z\text{-}mtv\text{-}7}$.** A la izquierda se muestra la placa radiográfica y a la derecha, la membrana de PVDF teñida con amido black.

Como se muestra en la **Figura 52A**, la única VLP que pudo ser detectada en esta tercera producción de VLPs$_{Z\text{-}SAgs}$ fue la VLP$_{Z\text{-}BALB14}$. A pesar de ello, todas las monocapas transfectadas demuestran estar expresando fusiones proteicas correspondientes a proteínas de alto peso molecular. En este sentido, la banda proteica que se observa en la muestra de VLPs$_{Z\text{-}BALB14}$ cercana al peso molecular de 38 kDa, podría corresponderse a la fusión proteica Z-BALB14 que previamente no había podido ser detectada. También hay que considerar que hubo problemas técnicos en la realización del ensayo, ya que se observa bastante pegado inespecífico y la intensidad de las señales fue baja, por lo que se revisaron los reactivos utilizados para la técnica de *Western Blotting*.

Por otro lado, en la **Figura 52B** se puede observar que el lote de VLPs$_{Z\text{-}mtv\text{-}7}$ fue válido, ya que hubo inmunodetección en la fracción de las VLPs purificadas, además que en la monocapa transfectada. Además, como se utilizó un marcador de peso molecular en la misma membrana, se puede identificar que la banda proteica reconocida por el anticuerpo anti Z se encuentra aproximadamente a 42 kDa (datos no mostrados).

CONCLUSIONES

En este capítulo nos hemos propuesto varios objetivos. En principio, el diseño y desarrollo de las herramientas moleculares que permitirán la expresión de cuatro variantes de SAgs del MMTV en sistemas heterólogos. Afortunadamente se ha logrado el objetivo propuesto, obteniendo las construcciones pZ-SAgs para la vehiculización de los mismos en VLPs derivadas de la proteína Z de JUNV y las construcciones pET28-SAgs para la expresión

de los mismos como subunidad en sistemas bacterianos. Además, tras el análisis bioinformático de las secuencias se pudo obtener la secuencia completa del SAg LA, lo cual es novedoso ya que únicamente se contaba con la secuencia parcial en bases de datos públicas.

Al alinear las secuencias obtenidas de las cuatro variantes, se pudo detectar que todas mantienen una gran conservación de su secuencia en la región 5', mientras que en la región de 3' se observa una zona con más polimorfismos. Dado que los cuatro SAgs poseen distinta especificidad de interacción con las cadenas Vβ, esto podría sugerir que los cambios en dicha región son los que determinan la especificidad. Más aún, sería interesante contar con las estructuras cristalizadas de dichas proteínas con la finalidad de analizar si los cambios de secuencias impactan efectivamente en la estructura de las mismas y como consecuencia, en la interacción con otras moléculas de interés para los objetivos de esta tesis.

Considerando la expresión de los SAgs en sistemas bacterianos, se utilizaron las construcciones pET28-SAgs con la finalidad de contar con controles sin vehiculizar para ensayos de actividad posteriores. Mediante el uso de herramientas bioinformáticas se han logrado determinar los pesos moleculares aproximados y los puntos isoeléctricos de cada una, permitiendo el acceso a mayor información al momento de llevar a cabo la purificación. La predicción sobre la solubilidad de las proteínas es preocupante porque han obtenido valores menores a 0,5. Al avanzar en los ensayos de expresión, se pudo lograr la expresión de las cuatro variantes de SAgs-HT y se seleccionaron las condiciones óptimas: 37°C, inducción con IPTG 1mM, 200 rpm de agitación y 2 horas post-inducción. Algo interesante es que las proteínas BALB2-HT y BALB14-HT demostraron ser particularmente sensibles, sea a degradación o inestabilidad, ya que a las 4 horas de expresión desaparecía la banda proteica correspondiente a las mismas. Por otro lado, se pudo comprobar la identidad de todas las proteínas al realizar inmunodetección utilizando un anticuerpo monoclonal contra el *tag* de histidina únicamente en los cultivos inducidos y no en aquellos sin inducir. Comparando los resultados *in silico* con los hallazgos empíricos se puso en evidencia que los SAgs-HT expresados en bacterias tienen exactamente el peso molecular esperado para los mismos, evidenciando la ausencia de modificaciones postraduccionales.

Al avanzar en la caracterización de las proteínas se encontró que todas son insolubles en las condiciones ensayadas, también reforzando los resultados obtenidos mediante el uso de herramientas bioinformáticas. En consecuencia, se escaló para producir las proteínas utilizando cultivos de 250 mL y se fraccionaron los cuerpos de inclusión, que posteriormente se solubilizaron en un *buffer* que contiene urea 8M. La purificación utilizando la columna de níquel fue exitosa, logrando eluir con una buena pureza la proteína esperada. Luego, se llevó a cabo una diálisis en dos pasos en la cual se observó que mtv-7-HT se volvió totalmente insoluble, por lo que se intentó

una diálisis escalonada que lamentablemente arrojó el mismo resultado. Ante la falta de soluciones al respecto, se evaluó si el agregado de un *buffer* con pH distinto al de elución puede modificar el estado de solubilidad de la proteína, observando un leve aumento de la solubilidad al diluir 1/10 con *buffer* pH 2.

Por otro lado, las construcciones pZ-SAgs fueron utilizadas para la vehiculizar cuatro variantes de SAgs de MMTV en VLPs derivadas de la expresión de la proteína Z de JUNV en células HEK293T. Mediante el uso de herramientas bioinformáticas se han logrado predecir los pesos moleculares esperados para cada una de las variantes y la ausencia de dominios transmembrana que puedan impedir la correcta vehiculización considerando el protocolo de purificación estandarizado. Además, se ha podido reconocer la presencia de dominios RKRR compartidos entre todas las variantes, lo que podría constituir un sitio de reconocimiento y proteólisis inducido por furina. Luego de transfectar las construcciones pZ-SAgs se pudo comprobar la expresión de las proteínas de fusión en la monocapa mediante inmunodetección utilizando un suero policlonal anti Z. A pesar de ello, se notó una evidente diferencia entre los resultados *in silico* y los hallazgos empíricos ya que las Z-SAgs demostraron un peso molecular menor al esperado. Esto podría deberse a los cambios postraduccionales que aporta este sistema, pudiendo ser mediados por proteasas tales como la furina y otras modificaciones desconocidas hasta el momento. A pesar de ello, se avanzó en la purificación de las VLPs correspondientes, logrando caracterizar la presencia de proteínas de fusión de las mismas. En ese sentido, algunos de los lotes purificados fueron posteriormente utilizados para llevar a cabo ensayos biológicos, tema que se abordará en el **Capítulo V**.

CAPÍTULO V: CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y PROPUESTA DE UN MÉTODO PARA EL ANÁLISIS DEL REPERTORIO DE LINFOCITOS T

INTRODUCCIÓN

Superantígenos virales como potencial terapia contra linfomas y leucemias

Como se indica en el **Capítulo I**, el término superantígeno se refiere a moléculas que son capaces de causar una sobrecarga del sistema inmune y estimular a 1 de cada 5 linfocitos del repertorio total de un organismo. A grandes rasgos los SAgs típicamente son capaces de activar a los linfocitos reactivos, inducir su proliferación y como consecuencia su anergia u apoptosis. Las consecuencias de los SAgs dependen en gran parte del estado de diferenciación de las células con las cuales interactúan, como se ha reportado previamente (Deacy et al., 2021).

Algunos trabajos previos con SAgs virales han mostrado que los mismos no son capaces de inducir proliferación a las células con las cuales interactúan, diferenciándose de los SAgs bacterianos (Ferrero et al., 1998). Sin embargo, aún no se encuentra clara la cronología ni las consecuencias de los diversos procesos que ocurren tras la interacción de los SAgs virales con los linfocitos reactivos. Con la intención de postular a los SAgs del MMTV producidos en alguno de todos los sistemas heterólogos que se abordan en la presente tesis como una posible terapia contra leucemias y linfomas, nos propusimos realizar ensayos de actividad biológica que imiten las condiciones de las células cancerosas de dichas patologías. Como meta final nos planteamos el uso de muestras de pacientes con diagnóstico de leucemias o linfomas T. Para ello, es necesaria la optimización de diversos procesos previos, para establecer dosis de VLPs, así como la puesta a punto de los métodos de cuantificación de las variables a considerar.

Una de las mayores dificultades de los ensayos planificados para estandarizar los resultados es la naturaleza de la interacción entre SAgs virales y los linfocitos T. Como la especificidad de interacción ocurre dependiendo las regiones variables de las cadenas Vβ de los TCR, para seleccionar el mejor tratamiento es necesario caracterizar qué cadenas Vβ portan las células cancerosas antes de los tratamientos. Como ese dato no es relevante para la clínica del paciente ni tampoco se relaciona con decisiones terapéuticas, es una tarea que debería estar a cargo de nuestro equipo al recibir las muestras. Por otra parte, la caracterización de la presencia, ausencia y modulación de las diversas variantes Vβ a lo largo de los ensayos biológicos permitirá confirmar si el tratamiento propuesto es específico y por lo tanto su uso implicaría ventajas con respecto a los tratamientos actuales y sus efectos secundarios generalizados.

Caracterización de cadenas Vβ en linfocitos T

De acuerdo con la base de datos IMGT, en ratones hay 15 variantes de las regiones Vβ de los linfocitos T, mientras que en los seres humanos hay al menos 30 variantes. Dado que la generación del TCR es llevada a cabo mediante rearreglos génicos, las secuencias deben ser caracterizadas mediante secuenciación del ARN total de las muestras o *single cell sequencing*. En la actualidad no hay datos sobre la abundancia relativa de regiones Vβ en condiciones fisiológicas ni tampoco patológicas, considerando como ejemplo los casos de leucemias o linfomas de pacientes. Además, los rearreglos génicos, así como la abundancia relativa de las variantes Vβ en cada persona es única y no son rasgos heredados (Zhou et al., 2006).

El objetivo de este capítulo es caracterizar la actividad biológica de las VLPs portando los SAgs y los SAgs libres utilizando líneas celulares neoplásicas y muestras de dadores sanos. Con la finalidad de caracterizar la especificidad del tratamiento y ante la imposibilidad de acceder a un panel de anticuerpos monoclonales específicos para cada variante de Vβ, en este capítulo se propone el desarrollo inicial de la realización de un protocolo alternativo basado en PCR tiempo final.

Los materiales y métodos de este Capítulo se encuentran detallados en la Sección II, páginas 67 a 88.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diseño experimental

Tal como se abordó previamente para poner a prueba la hipótesis de la presente tesis, se planteó como meta el uso de muestras de pacientes con linfomas y leucemias. Sin embargo, antes de avanzar al uso de tan valiosas muestras, nos propusimos la caracterización de la actividad biológica de los SAgs virales del MMTV utilizando otros sistemas más accesibles.

Inicialmente la idea planteada fue contrastar el efecto de las VLPs portando los SAgs con los efectos de los SAgs libres, lo cual no fue posible dado que los SAgs libres no pudieron purificarse en forma soluble utilizando sistemas bacterianos. Como consecuencia, nos propusimos evaluar el efecto intrínseco de las $VLPs_{Z}$, sin la presencia de los SAgs y con la finalidad de corroborar que la actividad observada se deba a dichas proteínas y no a la plataforma vehiculizadora en sí. La generación de las VLPs sólo con la proteína Z no es posible y a causa de ello nos propusimos el uso de $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ como control negativo de inducción a la apoptosis. Dado que dichas VLPs son inmunomoduladoras, podrían además servir como control positivo para los ensayos de proliferación.

Por otro lado, para la realización de los ensayos requerimos por un lado CPA para la presentación de los SAgs y por otro lado linfocitos T como objetivo del tratamiento. Considerando que los linfocitos T solo sobreviven hasta 2 semanas *in vitro*, las alternativas son realizar ensayos con tiempos menores a ese utilizando linfocitos no transformados, o líneas celulares establecidas a partir de linfocitos T. La única línea celular que cuenta con dicha característica es la Jurkat, con la cual hemos tenido diversas dificultades para acceder y manipular en nuestro laboratorio. Como consecuencia, procedimos a utilizar la aproximación fisiológica más cercana posible a las muestras de pacientes, que se corresponde con la fracción de células mononucleares de sangre periférica de dadores sanos. En ese sentido, se cuenta con los linfocitos T como célula respondedora al tratamiento y a los monocitos como CPA.

Evaluación de la actividad biológica utilizando células mononucleares humanas

Una vez que contamos con los avales de los Comités de Ética correspondientes, comenzamos los ensayos utilizando células mononucleares de sangre periférica de dadores voluntarios sanos. Al principio se tomaron aproximadamente 20 mL de sangre venosa, se heparinizó y se sembró diluida a la mitad sobre un colchón de Ficoll, purificando las células mononucleares mediante el gradiente de densidad formado. Las células mononucleares fueron recuperadas, lavadas y marcadas con CFSE en caso de corresponder. En este modelo la fracción de las células mononucleares incluyen los linfocitos como células objetivo y los monocitos como CPAs.

Visualización a la lupa de los cultivos

Los linfocitos son células que viven en suspensión y por lo tanto se cultivan de esa misma forma en cultivo celular. Las mismas forman racimos celulares en ausencia de estímulos, pero tras visualización al microscopio se puede observar si se encuentran en aparente proliferación, o si se encuentran en un proceso de muerte/lisis celular, donde su morfología suele ser más pequeña e individual. Con el objetivo de analizar los eventos macroscópicos que ocurren al ser tratadas, se realizó la visualización de los distintos pocillos cada 24 horas de las células del dador 2, y una imagen representativa de los mismos se muestran en la **Figura 53**.

Figura 53. Microscopía de los cocultivos del dador 2 al día 5 del experimento. Las células fueron observadas con una lupa invertida utilizando luz blanca y el objetivo 10X.

Como se muestra en la **Figura 53**, la observación al microscopio de los cultivos estimulados permite inferir los pocillos en los cuales estaría ocurriendo la activación o proliferación de las células. Al analizar las imágenes de microscopía se puede ver a grandes rasgos que las células estimuladas con las VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ han causado la activación y probable proliferación de las mismas. Si se compara con el control de PBS, tanto las células estimuladas con las VLPs$_{Z\text{-}LA}$ cómo con VLPs$_{Z\text{-}BALB2}$ demuestran un patrón de mayor cantidad de cúmulos.

Análisis de la proliferación celular

Considerando la actividad esperada para los SAgs estándar, se esperaría que al interactuar con linfocitos reactivos al mismo, ocurrirá la activación, proliferación y posterior muerte celular de los mismos. Con la finalidad de establecer la cronología de dichos eventos y caracterizar la actividad de las VLPs$_{Z\text{-}SAgs}$, nos propusimos inicialmente evaluar la inducción a la proliferación. Para analizar la proliferación celular las células fueron teñidas con CFSE al comienzo del experimento y luego se plaquearon 10^5 células por pocillo, junto con distintos tratamientos. Este ensayo se realizó en dos oportunidades, utilizando sangre de dos dadores distintos. Con la muestra del dador 1 se utilizaron 200 ng de VLPs$_{Z\text{-}mtv\text{-}7,}$ PBS o 54 ng de VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ que fue la cantidad proporcional de Z en función de la concentración de las VLPs$_{Z\text{-}mtv7}$. Para la muestra del dador 2 se utilizaron 200 ng de cada tratamiento, considerando como controles negativos PBS y VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$. Cada 24 horas se evaluó la intensidad de fluorescencia media de la población de linfocitos, resultados que se muestran en la **Figura 54.**

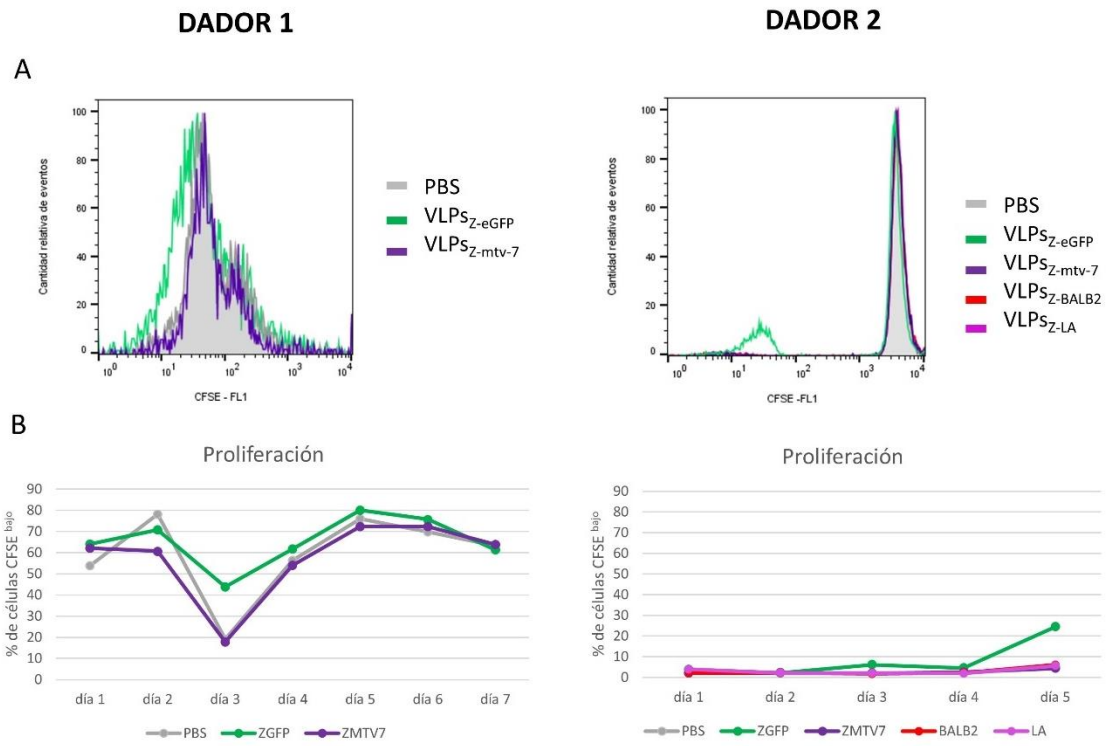


Figura 54. Perfiles de proliferación causados por las distintas VLPs$_{Z\text{-}SAgs}$. Las células mononucleares fueron teñidas con CFSE al comenzar el experimento y se evaluó la señal de fluorescencia emitida en el canal FL1 cada 24 horas. Los resultados de las células estimuladas con PBS se muestran en gris claro, las estimuladas con VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ se muestran en verde, las estimuladas con VLPs$_{Z\text{-}mtv\text{-}7}$ se muestran en violeta, las estimuladas con VLPs$_{Z\text{-}BALB2}$ se muestran en rojo y las estimuladas con VLPs$_{Z\text{-}LA}$ se muestran en rosa. IZQ: Resultados con la muestra del dador 1. DER: Resultados con la muestra del dador 2. **A. Histograma superpuesto de la señal FL1.** Resultados correspondientes a los días 6 y 5 de cultivo, respectivamente. **B. Porcentaje de células en proliferación en función de los días de experimento.**

Como se puede observar en la **Figura 54B**, ninguna de las VLPs$_{Z\text{-}SAgs}$ demostraron inducción de la proliferación a lo largo de todos los días de ensayo. El patrón mostrado es similar a las células tratadas con PBS que sería el control negativo. Se observan algunas diferencias con respecto a las células tratadas con VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$, que inducen la proliferación de las células especialmente considerando el día 5 de la muestra del dador 2. La comparación entre las señales obtenidas para los distintos tratamientos se observa en la **Figura 54A DER**, demostrando una pequeña proporción de células con baja señal en FL1, únicamente para las células tratadas con VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$.

Con respecto al dador 1, se observa un estado proliferativo basalmente más alto que para el dador 2, donde las VLPs$_{Z\text{-}mtv7}$ mantienen un patrón muy similar al del PBS. Sin embargo, se observaron algunas diferencias con respecto al tratamiento con VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$, ya que al día 6 se

detecta una población que demuestra baja señal de CFSE (**Figura 54A IZQ**). En la caracterización de las células proliferando día a día, se observa una baja para todos los tratamientos, demostrando más diferencias entre lo que causarían las $VLPs_{Z\text{-}eGFP,}$ pero puede deberse a un artefacto técnico.

Análisis de muerte celular

Se ha podido observar que ninguna de las $VLPs_{Z\text{-}SAgs}$ evaluada es capaz de inducir proliferación celular en las condiciones ensayadas, por lo que se procedió a evaluar la inducción a la muerte celular. Existen diversos tipos de muerte celular, pero lo ideal en estos casos es que ocurra mediante apoptosis, ya que no es un proceso inflamatorio y permite en forma ordenada deshacerse de los restos celulares. La muerte celular puede evaluarse simplemente utilizando colorantes vitales como el ioduro de propidio, pero afortunadamente en nuestro laboratorio contamos con anexina V, un reactivo que permitirá determinar la presencia de apoptosis. La doble marcación con ioduro de propidio y anexina V permite determinar el perfil de muerte celular, así como la viabilidad de las mismas. Mientras que el ioduro de propidio (IP) es un colorante vital y las células IP positivas se encuentran muertas, las células IP negativas se consideran viables. Por otro lado, la anexina V es una molécula que se une a la fosfatidilserina de la membrana plasmática celular, que generalmente se encuentra en la cara interna de las mismas. Es por ello que las células anexina V positivas están transitando un proceso de apoptosis, durante el cual la membrana plasmática comienza a involucrarse en un fenómeno llamado *flip flop* que es un movimiento transbicapa y por el cual la fosfatidilserina se presenta en la cara externa de la membrana. Al encontrarse en la cara externa de la membrana, es reconocida por la anexina V y por lo tanto se identifican como células apoptóticas tempranas. Las células IP+, Anexina V negativas se encuentran muertas, mientras que las doble positivas son células que se encuentran en apoptosis tardía y las que solo son positivas para anexina V, se encuentran en apoptosis temprana.

Con la intención de determinar la cronología de los fenómenos que ocurren entre los linfocitos y la interacción con las $VLPs_{Z\text{-}SAgs}$, nos propusimos evaluar los perfiles de muerte celular y viabilidad mediante la doble tinción mencionada anteriormente, cada 24 horas. Para ello, se utilizaron las muestras provenientes de los mismos 2 dadores sanos, en experimentos independientes y cuyos resultados se muestran en la **Figura 55**.

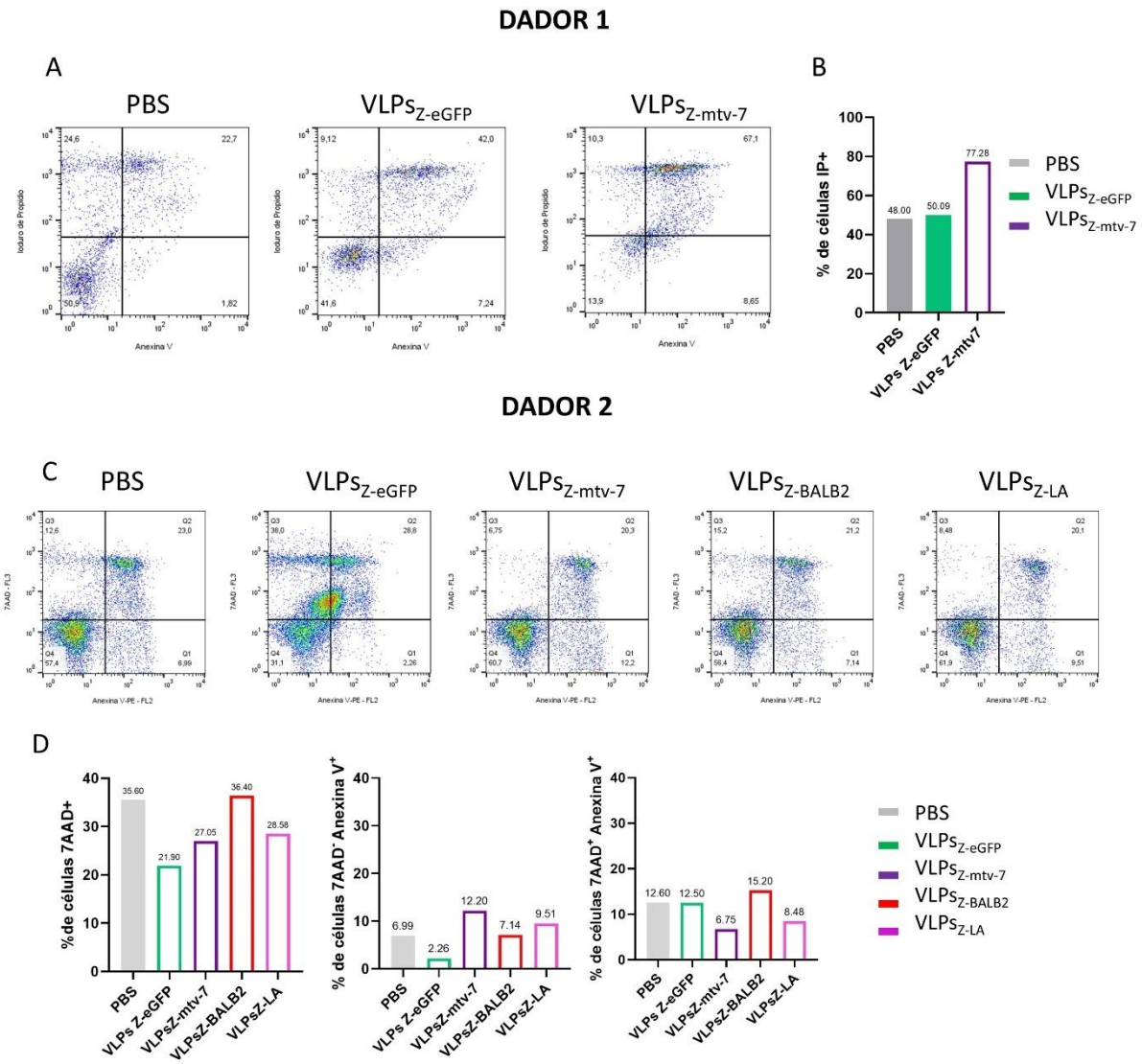


Figura 55. Perfiles de inducción a la muerte celular. Los resultados de las células estimuladas con PBS se muestran en gris claro, las estimuladas con VLPs$_{Z\text{-}eGFP}$ se muestran en verde, las estimuladas con VLPs$_{Z\text{-}mtv\text{-}7}$ se muestran en violeta, las estimuladas con VLPs$_{Z\text{-}BALB2}$ se muestran en rojo y las estimuladas con VLPs$_{Z\text{-}LA}$ se muestran en rosa. Cada 24 horas las células fueron marcadas con IP/anexina V-FITC o 7-AAD y anexina V-PE y se analizó la señal en los canales correspondientes utilizando un citómetro de flujo. **A. *Dot plots* de la doble marcación al día 6 de cocultivo.** Las células fueron obtenidas del dador 1. **B. Análisis porcentuales de las células muertas.** Se graficaron los porcentajes de células IP positivas para las células derivadas del dador 1, al día 6 de cocultivo. **C. *Dot plots* de la doble marcación al día 5 de cocultivo** Se muestran los *dot plots* correspondientes a las señales combinadas de ambas marcaciones al día 5 de co-cultivo para las células tratadas. **D. Análisis porcentuales de los perfiles de muerte celular.** Izq: Se muestran los valores porcentuales de las células positivas para 7-AAD, correspondientes a las células no viables; Centro: Se muestran los valores porcentuales de las células positivas para Anexina-V y negativas para 7-AAD correspondientes

a las células en apoptosis temprana; Der: Se observan los valores porcentuales de las células doble positivas correspondientes a las células en apoptosis tardía.

Como se puede observar en **Figura 55A** al día 6 del experimento hay un porcentaje basal de muerte celular relativamente alto, ya que las células tratadas con PBS muestran solo un 50,9% de células vivas. Por otro lado, las células tratadas con $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ mostrarían un 42% de células en apoptosis tardía y las células tratadas con $VLPs_{Z\text{-}mtv\text{-}7}$ mostrarían un 67% de células en apoptosis tardía. Asimismo, el tratamiento con cualquiera de las dos VLPs fue capaz de modificar el perfil de las células, ya que se observa un corrimiento de la nube de células vivas hacia el centro, en comparación con el tratamiento control. Se han identificado artefactos técnicos en los datos obtenidos por citometría de flujo, y por esa razón se decidió evaluar únicamente las células IP positivas como una idea para considerar la inducción a la muerte celular, además de repetir el ensayo y evaluar otras combinaciones de fluoróforos.

Utilizando las células del dador 1, al evaluar la inducción a la muerte celular mediante los porcentajes de células IP+, se puede notar que las $VLPs_{Z\text{-}mtv\text{-}7}$ fueron capaces de causar casi un 80% de muerte celular a los 6 días de experimento, en contraste con aproximadamente un 50% que demostraron tanto las células sin tratar como las células tratadas con VLPs libres de SAgs (**Figura 55B**). Los resultados obtenidos son provisorios, porque de hecho al ser una sola muestra no pueden realizarse análisis estadísticos para evaluar si ese casi 30% de diferencia con la VLP que porta el SAg tiene un efecto real o es un artefacto. En ese sentido, se podría decir que se observó una tendencia al aumento en la muerte celular tras incubar células mononucleares de sangre periférica con $VLPs_{Z\text{-}mtv\text{-}7}$.

Al repetir el ensayo utilizando células de otro dador (dador 2), se pudo observar que a los 5 días de experimento aún se observa una gran cantidad de células vivas (7-AAD negativas), sugiriendo que es necesario continuar optimizando los tiempos de ensayo (**Figura 55C**). Además, se puede observar que ninguno de los tratamientos indujo una gran muerte celular como lo observado en el experimento previo. Una de las particularidades observadas en este experimento es la aparición de una población celular en el centro de los cuatro cuadrantes al tratar las células con las $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ que podrían deberse a células necróticas tras una fuerte activación. Sin embargo, para poder confirmar que el proceso que están atravesando es necrosis, será necesario evaluar otros marcadores específicos como por ejemplo colorantes de ADN.

Si se comparan numéricamente los resultados obtenidos tras la incubación con las distintas variantes de $VLPs_{Z\text{-}SAgs}$ se pueden observar leves diferencias (**Figura 55D**). En principio, como se observa un artefacto extraño en las células tratadas con $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$, la población potencialmente necrótica fue excluida de los análisis. Al analizar los porcentajes de células 7-AAD+, es decir células muertas, se puede observar que uno de los mayores porcentajes lo causó

el tratamiento con PBS, lo cual tiene lógica ya que la falta de estímulos podría causar que los linfocitos en cultivo no se mantengan vivos en un contexto *in vitro*. Sin mucha diferencia contra el control negativo, el tratamiento con $VLPs_{Z\text{-}BALB2}$ causó la mayor proporción de células muertas, llegando a ser del 36,4% (**Figura 55D, izquierda).** Por otro lado, al analizar los porcentajes de las células en apoptosis temprana se observa que resaltan las $VLPs_{Z\text{-}mtv\text{-}7\ con}$ un valor de 12,2% y las $VLPs_{Z\text{-}LA}$ con un valor de 9.51%, contra el control negativo que mostró un 6,99% (**Figura 55D, centro**). Por último, las células tratadas con $VLPs_{Z\text{-}BALB2}$ son las que mostraron mayor inducción a la apoptosis tardía, con un valor de 15,2% en comparación contra un 12,6% del control negativo (**Figura 55D, derecha**). Vale la aclaración nuevamente que los resultados obtenidos son provisorios y no tienen un sustento estadístico como para asegurar que los efectos observados serán así.

Es importante aclarar aquí la complejidad e implicancias de los ensayos realizados. Por un lado, es necesario mencionar nuevamente que los experimentos realizados con células mononucleares son la aproximación más cercana a un contexto fisiológico que hemos podido conseguir. Es así, que el ideal para evaluar la actividad biológica serían bien muestras de dadores sanos con las patologías que se plantea abordar e incluso xenoinjertos derivados de muestras de pacientes en modelos animales que permitan la evaluación de la actividad en un contexto de mayor complejidad inmunológica.

Por otro lado, los resultados obtenidos con células mononucleares podrían no reflejar el efecto terapéutico esperado, primero porque las células no son neoplásicas y por lo tanto los SAgs podrían causar fenómenos distintos en células transformadas. Segundo, porque en las muestras de pacientes con diagnósticos de leucemias y linfomas en general hay una sobrerrepresentación de determinados clones linfocitarios (en algunos casos 8 veces mayor que en una situación fisiológica) y entonces una terapia dirigida a los mismos causaría un efecto evidente en términos de proliferación o de muerte celular. En tercer lugar, se han podido observar diferencias entre los distintos tratamientos considerando que cada persona tiene un repertorio particular de linfocitos T. Es cierto que sería ideal aumentar la cantidad de muestras evaluadas, pero esto tampoco implicaría que puedan obtenerse conclusiones sustentadas por la estadística, ya que es muy difícil poder comparar muestras de diversos dadores que poseen distintos repertorios de linfocitos, con diversas abundancias relativas de cada clon. Como posible respuesta a ello y ante la posibilidad de en un futuro obtener muestras de pacientes, nos propusimos evaluar un protocolo para la caracterización y semi-cuantificación del repertorio de variantes Vβ para muestras humanas.

Caracterización de actividad biológica específica

Volviendo sobre la hipótesis de la presente tesis, se propone que los SAgs del MMTV son capaces de inducir apoptosis de forma específica a diversos clones Vβ y como

consecuencia, tendrían menores efectos secundarios al utilizarse como terapia. Previamente se analizó de forma preliminar utilizando muestras de 2 dadores sanos los efectos de las $VLPs_{Z\text{-}SAgs}$ con respecto a la inducción de la proliferación y la muerte celular. En dichos ensayos se realizó un duplicado para cada uno de los pocillos y sus respectivos tratamientos por cada día con la finalidad de analizar sus transcriptos. El objetivo principal es determinar las variantes Vβ tanto el día inicial del tratamiento para conocer el repertorio de linfocitos de cada muestra, pero además observar si hay una modulación de las cantidades relativas de cada uno en función de los distintos tratamientos. De alguna forma, nos permitirá analizar la especificidad de la actividad biológica en caso en que hubiere. Si bien esto también puede realizarse utilizando anticuerpos monoclonales, por cuestiones presupuestarias no contamos con un panel amplio de dichos reactivos. Además, hay algunas variantes de Vβ humanas que no cuentan con anticuerpos específicos para su detección, especialmente cuando se consideran las variaciones de cada una de las familias.

Con la finalidad de poner a prueba el flujo de trabajo del protocolo a utilizar, durante cada día de los ensayos de actividad biológica se recuperó la fracción celular y se congelaron los *pellets* secos a -80°C. Posteriormente se extrajo el ARN total de cada una de las muestras y se llevó a cabo una reacción de transcripción reversa. El ADNc resultante fue utilizado como molde en una reacción de PCR punto final utilizando *primers* específicos para β-actina humana con la intención de asegurar la integridad del mismo. En caso de observar un producto específico tras electroforesis en geles de agarosa, se avanzó en la realización de reacciones de amplificación mediante PCR utilizando los paneles de *primers* Vβ. El panel de *primers* consta de un único *primer reverse* y 30 *primers forward*, que se utilizan en tubos distintos, para evaluar los productos específicos.

Con la intención de optimizar los procedimientos a seguir se utilizaron inicialmente células mononucleares sin tratar, cuyos resultados se muestran en la **Figura 56**.

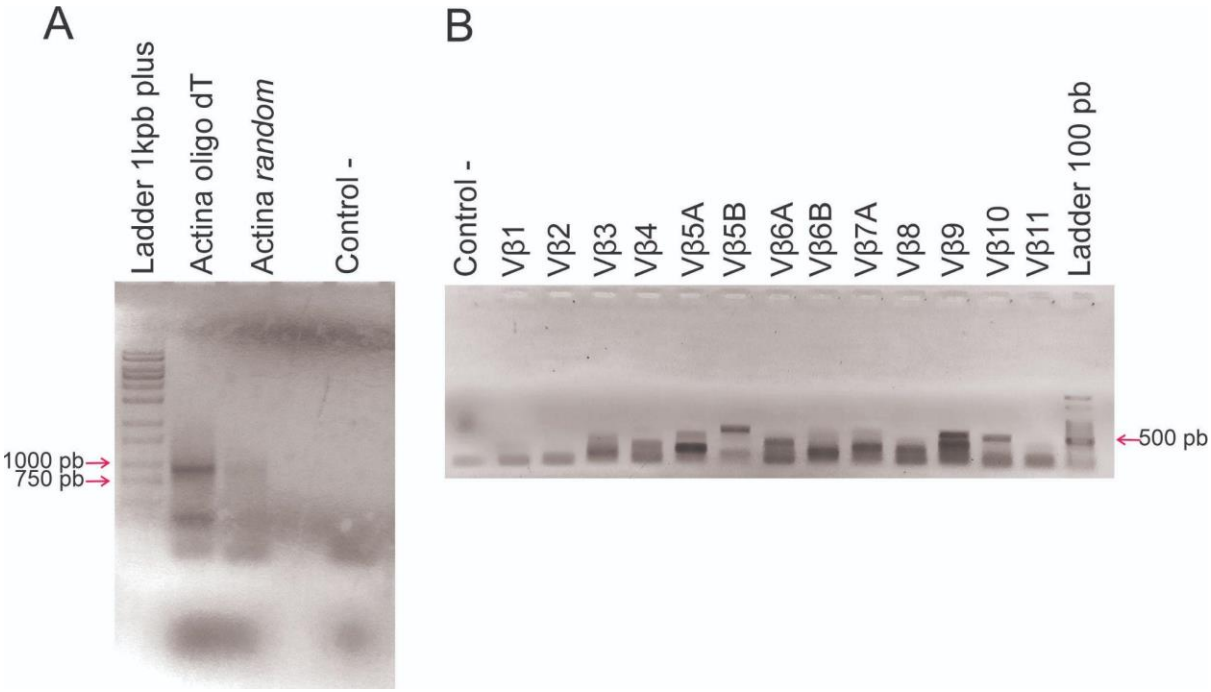


Figura 56. Optimización de los paneles de *primers* para amplificación de variantes de Vβ. A. Reacción de amplificación para β-actina humana. Se muestra la electroforesis en gel de agarosa en la cual se utilizó el ADNc como molde en una reacción de PCR para verificar la integridad como molde para reacciones posteriores. Los geles son de 0,8% m/v de agarosa y se tiñeron con bromuro de etidio. El tamaño esperado del producto es de 929 pb. En la primera calle se utilizó el marcador de peso molecular 1kpb plus (PB-L) para tener referencia de los tamaños de los fragmentos obtenidos y en la última calle se cuenta con el control negativo de la reacción donde no se colocó molde. **B. Reacciones de amplificación de algunas variantes de las cadenas Vβ.** Se muestra la electroforesis en gel de agarosa en la cual se utilizó el ADNc como molde en una reacción de PCR para detectar los fragmentos específicos para cada una de las variantes de cadenas Vβ. Los geles son de 0,8% m/v de agarosa y se tiñeron con bromuro de etidio. En la última calle se utilizó el marcador de peso molecular 100pb (PB-L) para tener referencia de los tamaños de los fragmentos obtenidos y en la primera calle se cuenta con el control negativo de la reacción donde no se colocó molde, utilizando los primers para la obtención de Vβ8.

Como se observa en la **Figura 56**, se lograron obtener resultados positivos al obtener el gen de β-actina humana, demostrando que el ARN total se encontraba íntegro y de buena calidad. Cuando se avanzó en utilizar dicho ADNc como molde para llevar a cabo las 32 mezclas de reacción considerando el mismo *primer reverse* y diversos *primers forward*, se encontró una gran diversidad de tamaños, no pudiendo obtener conclusiones al respecto (**Figura 56B**). Solo se muestran 14 mezclas de reacción porque el otro gel de agarosa donde se analizó la presencia de fragmentos relacionados con dichas variantes es ilegible por dificultades técnicas. Sin embargo, el método fue funcional para la totalidad de variantes. Sumado a esto, se encontró un obstáculo técnico muy grande ya que son muchas mezclas de reacción distintas, con *primers* que poseen

diversas condiciones para las reacciones de amplificación. Al seleccionar la temperatura de hibridación más baja de todos los *primers*, probablemente se favorezca la amplificación de fragmentos poco específicos. Como debe asegurarse que las diferencias se deban a la modulación de cada una de las variantes y no a un aumento de la cantidad total de células, siempre se utiliza como control un tubo con los *primers* de β-actina, replicando las concentraciones, reactivos y muestras utilizadas. Además, se añadió un control negativo para verificar que la combinación de *primers* Cβ y Vβ8 no obtenían producto. Sin embargo, una sola mezcla de reacción no es suficiente para asegurar que el producto obtenido es específico. Sumado a esto, no contábamos con un control positivo para confirmar el adecuado tamaño de los fragmentos esperados.

En función de los resultados obtenidos, nos propusimos caracterizar mejor el panel de *primers* utilizando herramientas bioinformáticas y realizar una selección de combinaciones de *primers* que sean relevantes para cada experimento. Para ello se comenzó a trabajar con la est. Ornella Flores, cuyo seminario de grado se centra mayormente en la caracterización de variantes de Vβ de clones linfocitarios mediante PCR tiempo final.

Tras una búsqueda bibliográfica se encontró un trabajo que proponía que el superantígeno mtv-7 era capaz de interactuar con los Vβ12, Vβ13, Vβ14, Vβ15 y Vβ23 de seres humanos. Es por ello que se recuperaron los *pellets* celulares de uno de los experimentos realizados, considerando el día 6 de tratamiento de los grupos PBS, $VLPs_{Z\text{-}mtv7}$ y $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$. Además, se utilizó como control un *pellet* de dichas células mononucleares al día 0 sin estímulos. Al igual que se realizó anteriormente, se extrajo ARN total, y las reacciones de PCR punto final fueron realizadas en simultáneo. Los primers utilizados fueron para β-actina humana, además de los requeridos para obtener específicamente los fragmentos de Vβ12, Vβ13a, Vβ14, Vβ15 y Vβ23a. Los resultados se muestran en la **Figura 57.**

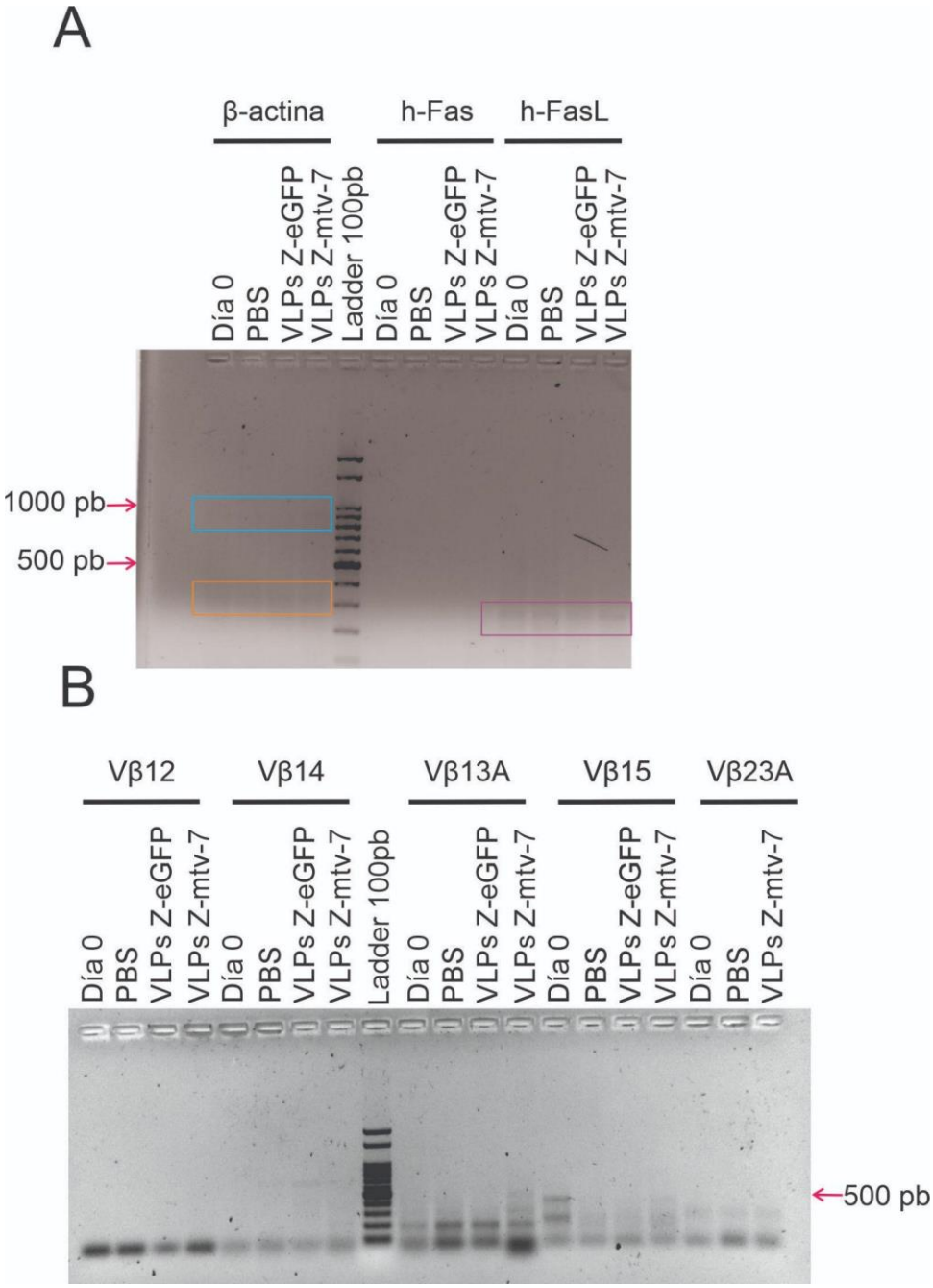


Figura 57. Optimización de una selección de *primers* para caracterizar el mecanismo de las VLPs$_{Z\text{-}mtv7}$. A. Reacción de amplificación de secuencias varias. Se muestra la electroforesis en gel de agarosa 2% m/v en la cual se utilizó el ADNc como molde. En la calle número 5 se utilizó el marcador de peso molecular 100pb (PB-L). A su izquierda se muestran los resultados de la amplificación del gen de **β**-actina en las cuatro muestras utilizadas. A su derecha se muestran los resultados de la amplificación de las secuencias Fas y FasLigando. **B. Reacciones de amplificación de una selección de variantes de cadenas Vβ.** Se muestra la electroforesis en gel de agarosa en la cual se utilizó el ADNc como molde en una reacción de PCR para detectar los fragmentos específicos para cada una de las variantes de cadenas V**β** que se muestran detalladas. El gel utilizado es de 0,8% m/v

de agarosa y se tiñó con bromuro de etidio. En la calle número 9 se utilizó el marcador de peso molecular 100pb (PB-L) para tener referencia de los tamaños de los fragmentos obtenidos.

Como se puede observar en la **Figura 57A**, la reacción de generación del ADN complementario no fue óptima y por esa razón se ven muy tenues los productos de β-actina, del tamaño esperado de 929 pb. En el recuadro celeste se muestra la región donde aparecen los productos específicos y en el recuerdo naranja se muestra la región donde aparecen los productos de un tamaño aproximado de 500 pb, que podría corresponderse a pegado inespecífico de los *primers*. Por otro lado, no se logró observar amplificación de las secuencias correspondientes al receptor Fas, probablemente por el pequeño tamaño de los mismos (186 pb). Al contrario, se observó amplificación utilizando los *primers* específicos para Fas Ligando cuyo tamaño predicho es de 344 o 298 pb y se condice con lo hallado en el recuadro violeta. Considerando que la imagen de la electroforesis no es óptima y sobre todo por las débiles bandas correspondientes a β-actina, no se pudieron llevar a cabo análisis de densitometría de bandas para determinar variaciones en los patrones transcriptómicos de las células en función de su tratamiento.

Por otro lado, al analizar la **Figura 57B** se puede concluir que la reacción de amplificación de la variante Vβ12 no fue exitosa ya se no se observa ningún fragmento amplificado además de dímeros de *primers*. Para Vβ14 se observa que algunas de las muestras demostraron la amplificación de una secuencia, pero su tamaño es mucho mayor al esperado. También se observan débilmente algunas señales de menor tamaño, pero no pueden utilizarse para hacer un análisis. Con respecto a Vβ13A se puede observar que todas las muestras fueron capaces de producir un producto del tamaño esperado y algo extraño ocurrió en la muestra de células tratadas con $VLPs_{Z\text{-}mtv7}$ porque aparecen otras especies amplificadas y parece aumentar la proporción de dímeros de *primers* en relación con el producto “específico”. En el caso de Vβ15 se observa una cierta inconsistencia entre las muestras, por diversidad de tamaño de los fragmentos y ausencia de la amplificación en algunos casos. Por último, se observa que los *primers* específicos para Vβ23A fueron capaces de lograr amplificación en las condiciones de reacción, a un tamaño que podría ser el esperado. De todas formas, la señal también es débil como para realizar análisis al respecto.

A pesar de los deficientes resultados obtenidos utilizando una selección de variantes de Vβ particularmente para evaluar células tratadas con las $VLPs_{Z\text{-}mtv7}$ a causa de problemas técnicos, se puede considerar un abordaje posible para futuros ensayos. Sin embargo, para el resto de los SAgs utilizados en la presente tesis, son desconocidos los clones Vβ que teóricamente deberían interactuar en forma específica al utilizar muestras humanas. Para superar dicho obstáculo, se procedió a realizar análisis bioinformáticos.

Homología entre humanos y ratones

Con la colaboración de la est. Denise Flores se realizó una predicción de los clones de Vβ humanos de interés con los que interactuaría cada variante de SAg. Dado que la especificidad para los SAgs de relevancia para la presente tesis es conocida en modelos murinos, se procedió a determinar la homología entre Vβ murinos y humanos utilizando secuencias consenso de bases de datos internacionales, cuyos resultados se muestran en la **Tabla 26**.

Vβ murino	Vβ humano homólogo (en orden decreciente de *score*)
Vβ14	Vβ20
Vβ2	No se encontró
Vβ6	Vβ17, Vβ28, Vβ29, Vβ14, Vβ13, Vβ12, Vβ15, Vβ11, Vβ21, Vβ6, Vβ3
Vβ7	Vβ3, Vβ15, Vβ14, Vβ13, Vβ12, Vβ11, Vβ17, Vβ28, Vβ32, Vβ8.2, Vβ8.1, Vβ23
Vβ9	Vβ24, Vβ28, Vβ15, Vβ12, Vβ17, Vβ11, Vβ14, Vβ3, Vβ13
Vβ8.1	Vβ12, Vβ13, Vβ14, Vβ3, Vβ28, Vβ15, Vβ17, Vβ30, Vβ8,2 Vβ11, Vβ8,1 Vβ5, Vβ9, Vβ24, Vβ1, Vβ6, Vβ10, Vβ22
Vβ8.2	Vβ12, Vβ13, Vβ14, Vβ3, Vβ28, Vβ15, Vβ1, Vβ30, Vβ11, Vβ24, Vβ22, Vβ8,2, Vβ8,1, Vβ5
Vβ11	Vβ8,3 Vβ8,2 Vβ8,1 Vβ8,4 Vβ8,5 Vβ6 Vβ26 Vβ21, Vβ25, Vβ18, Vβ22

Tabla 26. Homología predicha entre variantes de Vβ murinos y humanos utilizando herramientas bioinformáticas. Se muestran las variantes homólogas encontradas en orden decreciente de *score*.

Uniendo los resultados de la **Tabla 26** y la **Figura 30** que muestra las especificidades de Vβ murinas para cada SAg, se generó una tabla completa con potenciales variantes homólogas, generando la **Figura 58**.

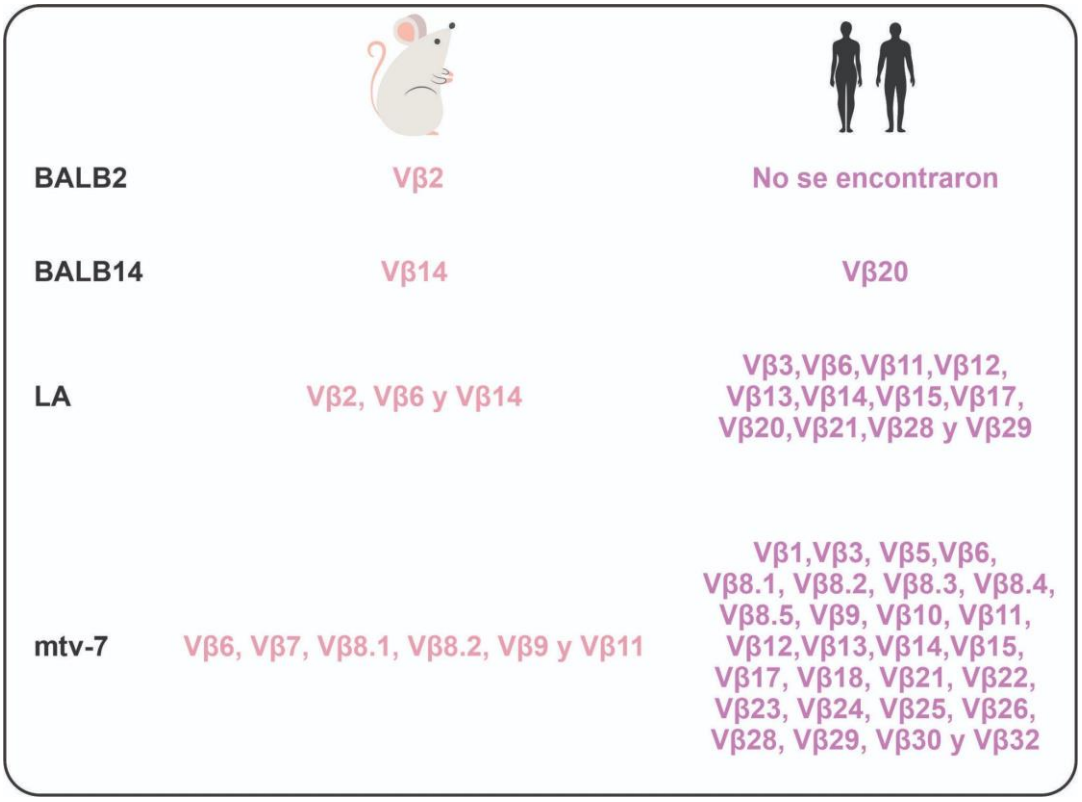


Figura 58. Resumen gráfico de variantes de Vβ murinas y humanas con las que interactúa cada SAg del MMTV utilizados en la presente tesis. A la izquierda se muestra el nombre del SAg, en el centro se muestran las variantes de cadena Vβ murinas y a la derecha, las variantes de cadenas Vβ humanas. La información fue obtenida tras el uso de herramientas bioinformáticas.

Los resultados que se muestran en la **Figura 58** deberán ser evaluados en forma empírica para que tengan sustento suficiente, pero brindan una aproximación para la selección de *primers* que se utilizarán para caracterizar las células tratadas de los experimentos de actividad biológica.

CONCLUSIONES

Se realizaron dos experimentos independientes con muestras de sangre periférica de dadores sanos, encontrando que ninguna de las $VLPs_{Z\text{-}SAgs}$ fue capaz de inducir proliferación a los 6 días de cocultivo, pero observando una tendencia hacia la inducción de una mayor muerte celular en comparación con el control. En este sentido, se encontró que las $VLPs_{Z\text{-}mtv\text{-}7}$ fueron las que causaron una mayor proporción de células muertas a los 6 días de co-cultivo, lo que podría explicarse tanto por la amplia acción del SAg que se vehiculiza, así como por el repertorio particular de los voluntarios sanos. En resumen, las $VLPs_{Z\text{-}SAgs}$ evaluadas demostraron en forma preliminar una tendencia a la inducción de mayor muerte celular que los controles.

Por otra parte, en este capítulo nos hemos propuesto el desarrollo inicial de un método para la caracterización del repertorio de linfocitos T en muestras humanas. Se pudo verificar que, aunque trabajoso, el protocolo propuesto es viable y se observa tanto integridad del ARN celular como productos de amplificación utilizando diversas combinaciones de *primers* del panel. Si bien se ha logrado establecer un protocolo para abordar los experimentos, no se ha podido validar la metodología por ausencia de controles necesarios que permitan establecer la especificidad del método. Por otro lado, se determinó que será necesaria la generación de paneles para el análisis propuesto, personalizando la selección de las variantes a analizar en función de los tratamientos aplicados. En este sentido, es necesario continuar optimizando los métodos para poder hacer uso del protocolo. Además, se pudieron amplificar algunos genes de interés para describir el mecanismo de funcionamiento de los SAgs como Fas y Fas ligando pero también es necesaria una optimización técnica, labor que continúa a cargo de la est. Ornella Flores en su seminario de grado.

Mediante el uso de herramientas bioinformáticas se pudieron determinar las homologías entre variantes de Vβ murinas y humanas, información novedosa ya que no se había podido encontrar dicho análisis en reportes bibliográficos. Uniendo dichos resultados con las especificidades Vβ en las interacciones con los SAgs del MMTV, se propuso una posible equivalencia entre las cuatro variantes de SAgs utilizadas en la presente tesis en muestras humanas. De esta forma, se podrán diseñar conjuntos de *primers* de forma más específica y básandose en datos previos, para poder verificar empíricamente lo propuesto. En este sentido, la información ya analizada, en conjunto con resultados continúan en desarrollo, permitirán la propuesta de paneles de *primers* que permitan analizar en detalle la modulación del repertorio de linfocitos T ante distintos estímulos, en lo que respecta a la presente tesis. Además, permitirán relativizar la actividad biológica observada utilizando muestras de dadores sanos que poseen diversidad de clones Vβ así como abundancia relativa de los mismos.

CAPÍTULO VI: VEHICULIZACIÓN DE SAGS VIRALES DEL MMTV EN VLPS UTILIZANDO SISTEMAS BACTERIANOS

INTRODUCCIÓN

VLPs generadas utilizando la proteína Z de JUNV

Como se abordó en los capítulos anteriores, en nuestro laboratorio tenemos experiencia en el diseño y producción de VLPs utilizando la proteína Z del virus Junín en contextos eucariotas. Estos procedimientos resultan de mucha complejidad en su desarrollo, además de onerosos en cuanto a los costos elevados de los insumos. Además, las $VLPs_Z$ vehiculizan los antígenos en la región interna, protegidos dentro de las vesículas. En ese sentido, durante el desarrollo del proyecto nos preguntamos qué impacto tendría una vehiculización de los SAgs en la parte externa de las VLPs.

En trabajos previos en nuestro laboratorio se llevó adelante un diseño de vehiculización de antígenos utilizando los elementos mínimos del sistema de JUNV, con la intención de presentar proteínas heterólogas expuestas en la cara externa de la membrana (De Ganzó, 2012). Lamentablemente los resultados demostraron que el sistema es muy poco eficiente y errático, ya que las VLPs producidas eran de tamaño heterogéneo y en algunos casos no se generaban (De Ganzó, 2012; Pastorini, 2019). Ante la necesidad de evaluar la vehiculización externa de los SAgs de MMTV, nos propusimos colaborar con otros grupos de investigación para incorporar nuevos conocimientos y técnicas.

Estrategias para el desarrollo de VLPs

El primer registro de uso de VLPs para la presentación de epítopes inmunogénicos fue utilizando la proteína pIII del bacteriófago f1 (de la Cruz et al., 1988). A medida que avanzó el tiempo se fueron utilizando las proteínas estructurales de otros virus para la generación de VLPs, dando lugar a diversos tipos de las mismas (Roy & Noad, 2009):

- Cápsides virales simples con una o dos proteínas estructurales (Parvovirus, virus del papiloma humano (VPH), Circovirus, Calicivirus, Virus de la Hepatitis E y Poliomavirus).
- Cápsides virales complejas con varias capas de proteínas virales (Rotavirus, Pircornavirus).
- Cápsides virales envueltas de membrana plasmática de las células hospedadoras, pudiendo incluir glicoproteínas (Influenza, VIH, Virus de la Hepatitis C, Arenavirus).

A grandes rasgos, las VLPs pueden producirse mediante dos metodologías distintas: por fusión proteica tras ingeniería genética o mediante conjugación *a posteriori.* Las vacunas más conocidas que se encuentran basadas en VLPs son Engerix® contra la Hepatitis B, así como las vacunas contra el VPH, que inducen protección contra algunas de las variantes más agresivas de dicho virus que causan cáncer de cuello de útero. Sin embargo, tales vacunas

fueron posibles porque las VLPs generadas se producen utilizando directamente la proteína viral de cápside de dichos virus. En este sentido, surgió la necesidad de generar formulaciones que permitan prevenir o tratar otras patologías no virales, o cuyas proteínas sean incapaces de generar VLPs. Esto impulsó el origen de las VLPs quiméricas, revolucionando la vacunología. Las técnicas empleadas en este campo habilitan la generación de VLPs portando diversos antígenos, incluyendo de naturaleza no peptídica y además permite mejorar los desarrollos previos en términos del sistema de producción o de las respuestas inmunológicas/terapéuticas generadas (**Figura 59**).

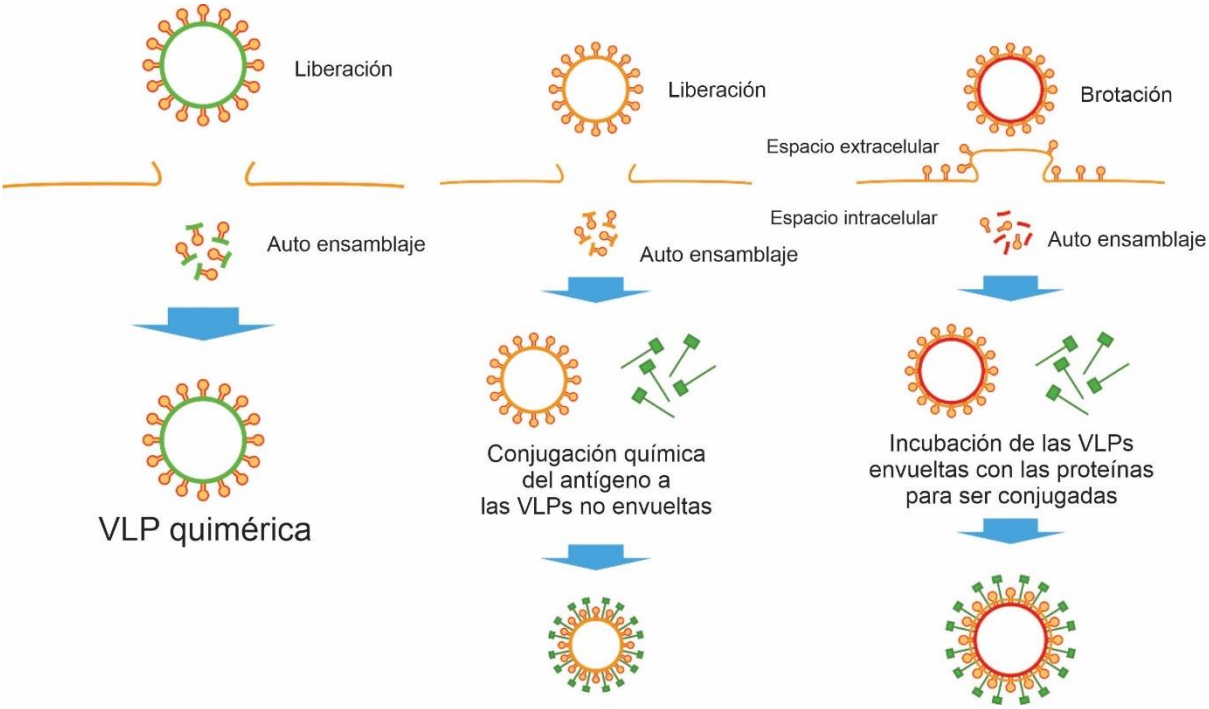


Figura 59. Procedimientos para el desarrollo de VLPs quiméricas. Izquierda: Proceso de brotación de una VLP quimérica generada mediante ingeniería genética. Centro: Proceso de brotación de una VLP generada mediante conjugación química de VLPs no envueltas. Derecha: Combinación de las dos técnicas anteriores.

El sistema de generación de VLPs utilizando la proteína Z de JUNV puede utilizarse únicamente mediante ingeniería genética. Esto es mediante el clonado del antígeno a vehiculizar fusionado al marco abierto de lectura de la secuencia que codifica para la proteína Z de JUNV, en el contexto del plásmido pZ. Debido a una falla de la producción al expresar la proteína Z sola en cultivos eucariotas, no resulta posible llevar a cabo la conjugación química de diversos antígenos sobre la VLP vacía.

La conjugación *a posteriori* contempla por un lado la producción de un “esqueleto” de VLP que luego será decorado con los antígenos a vehiculizar, que suele ser generalmente utilizando reacciones químicas que dan como resultado enlaces covalentes. Dicha estrategia

ha sido ampliamente utilizada para el desarrollo de diversos candidatos vacunales preventivos y terapéuticos (Caldeira et al., 2020). Uno de los más relevantes al respecto es el desarrollo RTS,S para la prevención de la malaria, una patología causada por el parásito *Plasmodium falciparum*. La vacuna está elaborada utilizando proteínas del parásito que se encuentran conjugadas en la superficie de VLPs generadas utilizando la proteína de cápside del virus de la hepatitis B. En este sentido, el desarrollo demostró una protección entre 30 y 50% de las personas inmunizadas, siendo la única vacuna disponible hasta el momento y generando inmunidad contra un parásito utilizando una plataforma de origen viral (RTS,S Clinical Trials Partnership et al., 2011).

VLPs derivadas de bacteriófagos

El laboratorio del Dr. Bryce Chackerian tiene amplia experiencia en el desarrollo de VLPs utilizando proteínas de cápside de diversos bacteriófagos. En particular han trabajado con los bacteriófagos Qβ, MS2 y AP205. Mientras que el primero permite el desarrollo de VLPs mediante conjugación química, los otros dos sistemas son para uso exclusivo mediante ingeniería genética ya que no portan lisina en su superficie que permite que ocurra la reacción de conjugación. La gran ventaja de estos sistemas de expresión es que la producción ocurre en bacterias, disminuyendo los costos y los tiempos de purificación de las partículas.

Además, el grupo de investigación liderado por el Dr. Chackerian ha generado diversos desarrollos utilizando dichas plataformas, que han demostrado una buena inmunogenicidad y efectos tanto preventivos como terapéuticos, dependiendo del objetivo (Francian et al., 2025; Nepal et al., 2025; Romano et al., 2025; Tangavelou et al., 2025). Dichos sistemas se conforman como una plataforma atractiva por su versatilidad, su bajo costo y por la baja probabilidad de tener anticuerpos previos, ya que sus componentes provienen de virus que infectan a bacterias. Sin embargo, resulta muy dificultoso eliminar la totalidad del LPS ya que de alguna manera forma parte de la estructura de las VLPs al utilizar las bacterias como sistema de expresión. Como alternativa de dicha problemática se puede utilizar la cepa ClearColi™ de *E. coli* BL21 que se encuentra libre de LPS (Mamat et al., 2013).

La capacitación en el uso de estas nuevas técnicas que no se encontraban disponibles en nuestro país impulsó la presentación a una beca de investigación para estadías cortas (3 meses) Fulbright-Secretaría de Educación. La postulación fue seleccionada y se llevó a cabo entre agosto 2024 y noviembre 2024 en el Laboratorio del Dr. Chackerian, correspondiente al Departamento de Genética Molecular y Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Nuevo México, que se encuentra en Albuquerque, Estados Unidos. En este capítulo se mostrarán todos los experimentos que se llevaron a cabo en el marco de dicha estancia de investigación.

Con la finalidad de evaluar la vehiculización de SAgs del MMTV en la cara externa de las VLPs y utilizando sistemas bacterianos, nos propusimos dos objetivos principales. Primero, vehiculizar dos versiones del SAg BALB2 en VLPs utilizando el sistema del bacteriófago AP205 y la estrategia de ingeniería genética. Por otro lado, vehiculizar dos versiones del SAg BALB2 utilizando nanojaulas sintéticas conjugadas a los antígenos mediante el sistema SpyCatcher/SpyTag.

Los materiales y métodos de este Capítulo se encuentran detallados en la Sección II, páginas 89 a 101.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Vehiculización de BALB2 utilizando el sistema AP205.

Diseño experimental

Con respecto al diseño experimental, para el tiempo estipulado de la colaboración se planteó la vehiculización de un solo SAg, seleccionando BALB2 por su monoclonalidad reportada en ratones. Sumado a ello, ante la posibilidad de evaluar adicionalmente la presencia del dominio RKRR en las modificaciones postraduccionales de la proteína y como consecuencia, su funcionalidad, se generaron dos variantes: BALB2 con su marco abierto de lectura entero y por otra parte CT, que se compone por el marco abierto de lectura de BALB2 luego del dominio RKRR.

Clonado molecular

Como se detalló anteriormente, para inducir la generación de VLPs mediante el sistema AP205 es necesario contar con el plásmido llamado pAPKP. En este sentido, se solicitó la síntesis de los plásmidos pTwist-BALB2 y pTwist-CT para luego transferir los marcos abiertos de lectura al plásmido de expresión pAPKP. El diseño experimental para obtener las construcciones plasmídicas requeridas puede observarse en la **Figura 60.**

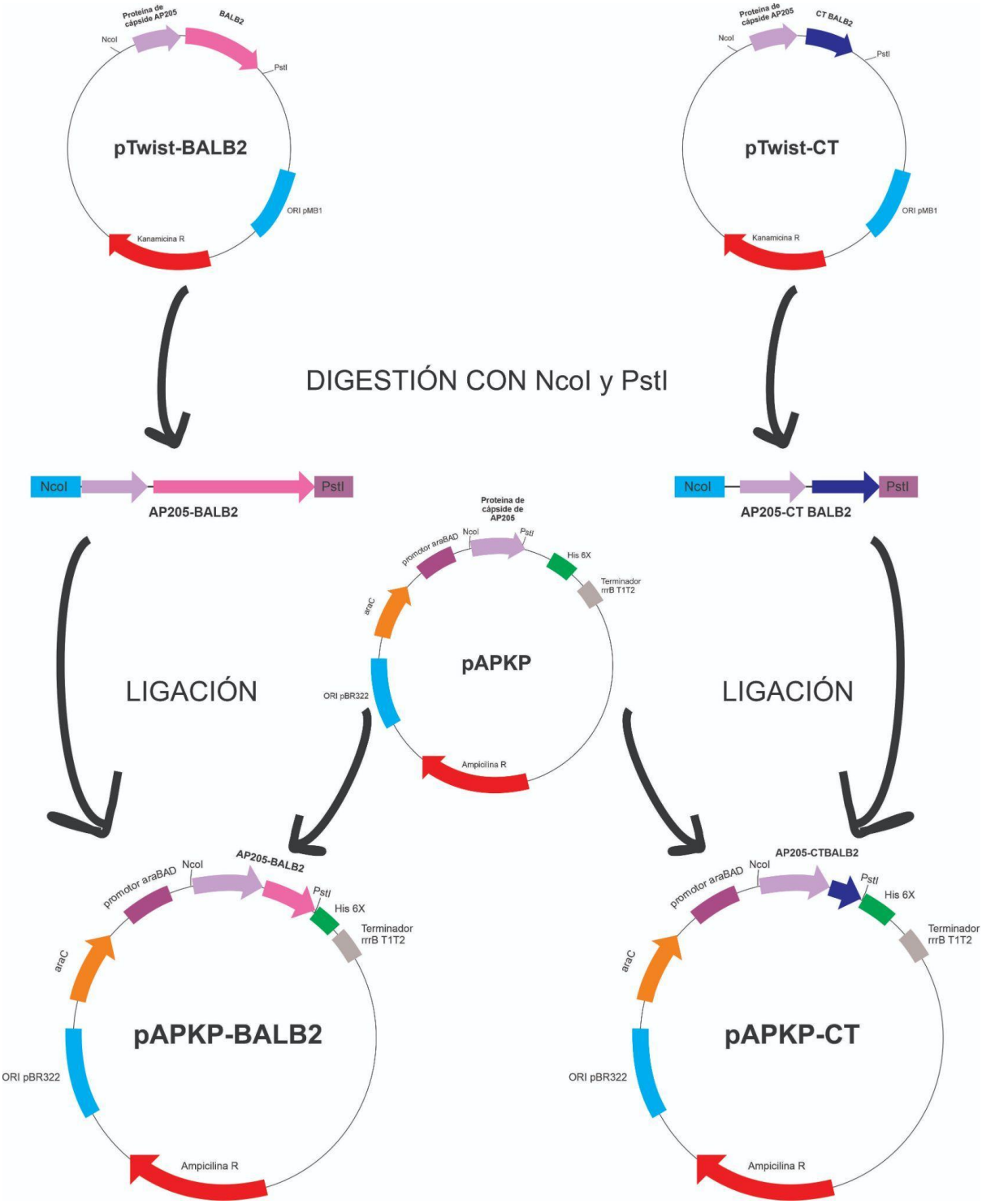


Figura 60. Estrategia molecular para el clonado de las dos variantes de BALB2 en pAPKP. Se muestra en forma simplificada el esquema de generación de las construcciones pAPKP-BALB2 y PAPKP-CT. Las secuencias codificantes para cada una de las variantes de BALB2 se obtuvieron tras digestión enzimática con NcoI y PstI de los plásmidos pTwist-BALB2 y pTwist-CT, respectivamente. Los fragmentos fueron posteriormente ligados con el vector pAPKP que también fue digerido con las mismas enzimas, dando como resultado las construcciones pAPKP-BALB2 y pAPKP-CT. Las secuencias de los genes de resistencia para

los distintos antibióticos se muestran en color rojo y los orígenes de replicación procariotas se muestran representados en color celeste. Además, en color naranja se muestra el gen araC, en violeta se representa el promotor araBAD, en verde se encuentra la secuencia repetitiva de 6 histidinas y en gris, el terminador rrrB T1T2.

Transferencia de los insertos al vector de expresión

Una vez recibidos los plásmidos, se analizó su integridad y tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa 1% y posteriormente se procedió a digerir con las enzimas de restricción para llevar a cabo el clonado molecular (**Figura 61**).

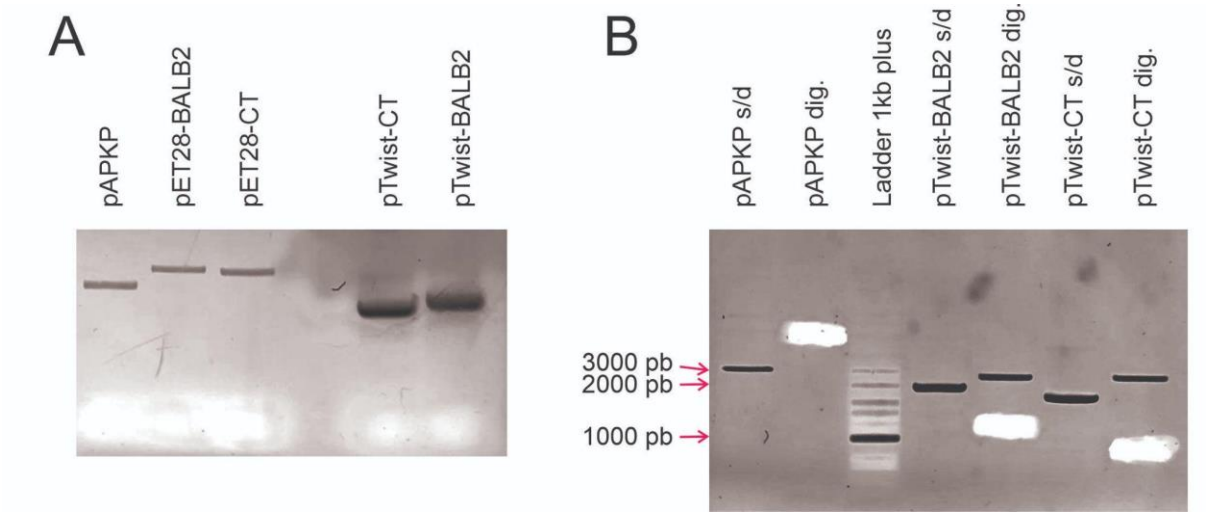


Figura 61. Verificación de los plásmidos solicitados y liberación de los fragmentos para su clonado en pAPKP. A. Verificación del material genético purificado. Una vez obtenidos los plásmidos en su forma liofilizada, los mismos fueron resuspendidos en agua ultrapura y transformados a bacterias *E. coli* 10G. Se prepararon cultivos bacterianos de 5 mL de cada construcción los cuales fueron sometidos a extracción de ADN plasmídico mediante el uso de un kit comercial y lo obtenido fue analizado mediante electroforesis en geles de agarosa 1% m/v. **B. Digestión enzimática de las construcciones con las enzimas NcoI y PstI.** Se observa el patrón de digestión obtenido tanto para el vector de expresión pAPKP, como las construcciones pTwist-BALB2 y pTwist-CT. Los huecos en los cuales no se observa gel se corresponde a la región donde se encontraban los fragmentos de ácidos nucleicos y fueron escindidos.

Como se observa en la **Figura 61A**, las extracciones de ADN plasmídico fueron eficientes. Por otra parte, al avanzar en las digestiones enzimáticas para el clonado molecular en pAPKP, se observó la liberación de los fragmentos esperados, que fueron escindidos del gel de agarosa (pAPKP de 3994 pb, pTwist-BALB2 de 1263 pb y pTwist-CT de 855 pb), como se muestra en la **Figura 61B**.

Pasado el tiempo de incubación de la ligación, se transformaron en bacterias *E. coli* 10G mediante protocolos de electroporación. Se obtuvieron varias colonias resistentes a

ampicilina y se procedió a verificar la presencia de los insertos en 2 colonias seleccionadas, mediante mapa físico por digestión enzimática (**Figura 62**).

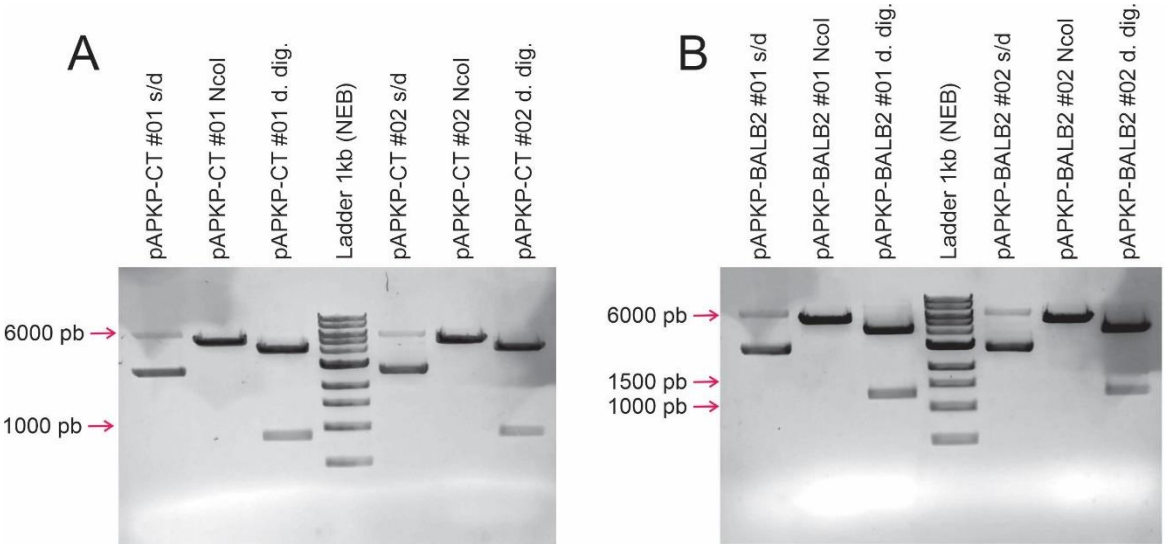


Figura 62. Verificación de colonias recombinantes mediante mapa físico por digestión con las enzimas NcoI y PstI. Los plásmidos obtenidos mediante la purificación de ADN plasmídico fueron sometidos a una digestión simple utilizando la enzima NcoI o ambas enzimas (NcoI y PstI) para verificar la liberación del fragmento clonado en pAPKP. Se muestran los resultados obtenidos para las colonias #01 y #02, y además en la calle número 4 se utilizó el *Ladder* 1kb (NEB). **A. Verificación de colonias con la construcción pAPKP-CT. B. Verificación de colonias con la construcción pAPKP-BALB2.**

Como se observa en la **Figura 62**, ambas colonias seleccionadas para cada una de las construcciones resultaron positivas ya que se observó la liberación de los fragmentos correspondientes a 855 pb para CT y 1263 pb para BALB2. Además, al linealizar los plásmidos tras digestión simple con NcoI se confirmó que tienen el tamaño esperado de 4849 pb y 5257 pb, respectivamente.

Análisis bioinformáticos

Finalizada la etapa de clonado molecular, se enviaron a secuenciar las colonias #01 de ambas construcciones, servicio que se tercerizó a la empresa GeneWiz. Las secuencias clonadas no demostraron mutaciones en las transferencias. Al analizar la identidad de pAPKP-CT se encontró que la secuencia entera presenta una alta homología a N_002700.2 (AP205 *complete genome*). Por otro lado, la secuencia de pAPKP-BALB2 presenta un 96.54% de homología a L13149.1.

Considerando que dichas construcciones serán destinadas a la expresión de proteínas en bacterias *E. coli*, se utilizaron herramientas bioinformáticas para predecir los pesos moleculares y otras características de las proteínas recombinantes, cuyo resumen se muestra en la **Tabla 27**.

Proteína	Peso molecular	Cantidad de aminoácidos	pI	Ubicación intracelular	Solubilidad
AP205 *Wild Type*	14 kDa	131	8.66	Amino terminal exterior, 0 hélices transmembrana	0.8289
AP205-CT	31,4 kDa	280	9.60	Amino terminal exterior, 0 hélices transmembrana	0.7672
AP205-BALB2	46,4 kDa	414	9.61	Amino terminal exterior, 0 hélices transmembrana	0.3780

Tabla 27. Resumen de las predicciones bioinformáticas de las proteínas AP205. Las primeras 3 columnas fueron determinadas utilizando la herramienta ProtParam, mientras que la presencia de dominios transmembrana fue predicha mediante el uso de HMMTOP y tanto la solubilidad como la usabilidad fueron determinadas utilizando la herramienta NetSolP - 1.0.

Expresión de las construcciones en E. Coli

Se comenzó evaluando la expresión de las construcciones AP205 *Wild Type* (WT), AP205-CT y AP205-BALB2 en las bacterias *E. coli* C41, inoculando 100 mL de medio líquido con kanamicina ON a temperatura ambiente en agitación. Al finalizar el tiempo estipulado se centrifugaron los cultivos bacterianos y se comenzó la purificación utilizando 5 mL de dichos cultivos, separando las fracciones solubles e insolubles de cada uno (**Figura 63**).

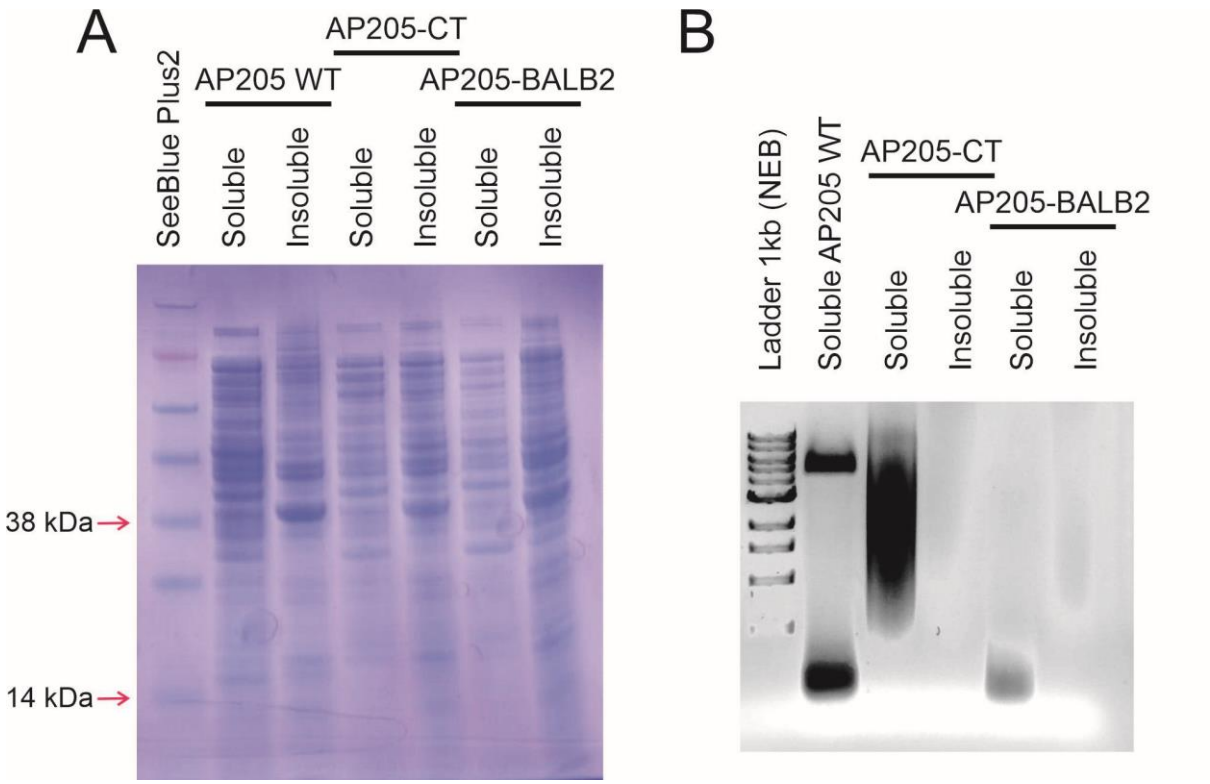


Figura 63. Prueba de expresión de las VLPs AP205 en bacterias *E. coli* C41. Para cada proteína se muestran las fracciones solubles e insolubles de la expresión de las construcciones a temperatura ambiente durante toda la noche y 200 rpm de agitación. **A. Electroforesis de las fracciones en geles de poliacrilamida 12% m/v desnaturalizantes utilizando lisados bacterianos. B. Electroforesis de las fracciones en gel de agarosa 1% m/v.**

Al analizar la **Figura 63A** se puede observar que no hay diferencias entre las fracciones de las 3 construcciones distintas. Es por ello que se decidió evaluar las mismas fracciones en un gel de agarosa 1%, que se muestra en la **Figura 63B.** Como se puede notar en dicha imagen, en la fracción soluble de las VLPs AP205 WT se visualiza una banda de material genético de gran tamaño, la cual se puede identificar como el ARN que da lugar a las VLPs, que se encuentra empaquetado en las proteínas de cápside. En el caso de AP205-CT se observa un patrón de degradación en la fracción soluble, evidencia suficiente como para asegurar que el empaquetamiento de las VLPs es incorrecto y probablemente no se encuentren íntegras. Por último, no se observa material genético para las AP205-BALB2, sugiriendo también un erróneo empaquetamiento de las VLPs.

Optimización de la expresión de las construcciones en *E. Coli*

Se analizó el efecto de la modificación de algunos parámetros de la expresión en el empaquetado de las VLPs. Se ensayó la expresión durante toda la noche a 37°C utilizando DO_{600} de 0,5 y mayor a 1, a 25°C utilizando un DO_{600} mayor a 1 y por último a 15°C utilizando un DO_{600} mayor a 1. Los resultados de dicho experimento se muestran en la **Figura 64**.

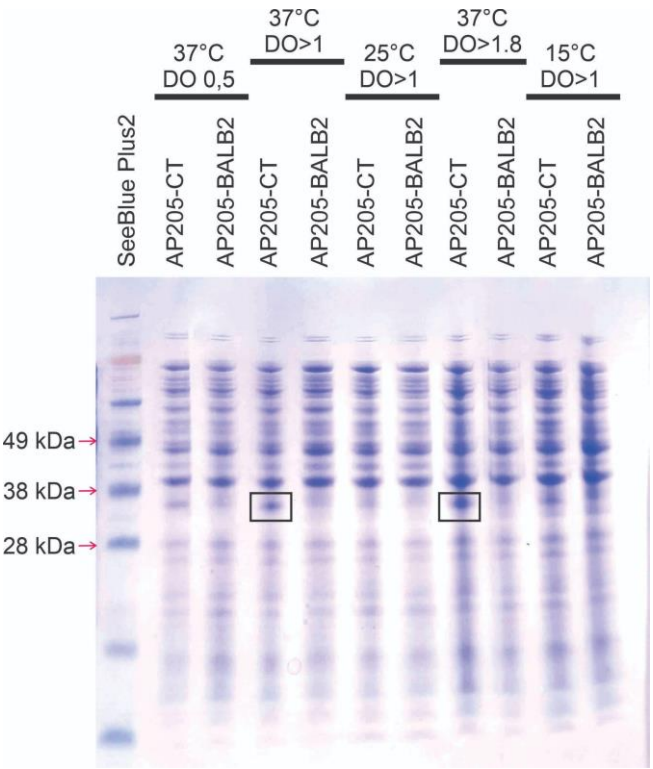


Figura 64. Optimización de la expresión de las VLPs AP205 en bacterias *E. coli* C41. Para cada proteína se muestran las fracciones solubles e insolubles de la expresión de las construcciones en distintas condiciones. En la primera calle se utilizó el marcador de peso molecular SeeBlue Plus2 y con los recuadros negros se marcan las posibles bandas de expresión de una de las construcciones (AP205-CT, PM 31 kDa)

Al analizar el resultado de todas las condiciones, se observó que las mejores para la expresión de AP205-CT fueron a 37°C a DO_{600} mayor a 1 y 37°C a DO_{600} mayor a 1.8. Por otro lado, no se logró observar una banda proteica que se corresponda con AP205-BALB2. Sin embargo, se decidió avanzar en la purificación de las VLPs utilizando dichas condiciones, utilizando cultivos líquidos de 100 mL, cuyos resultados se muestran en la **Figura 65**. Para validar el lote de VLPs es necesario hallar que el ARN de las fracciones se corresponde con la banda proteica, indicando que el material genético se encuentra encapsulado dentro de la estructura de las partículas.

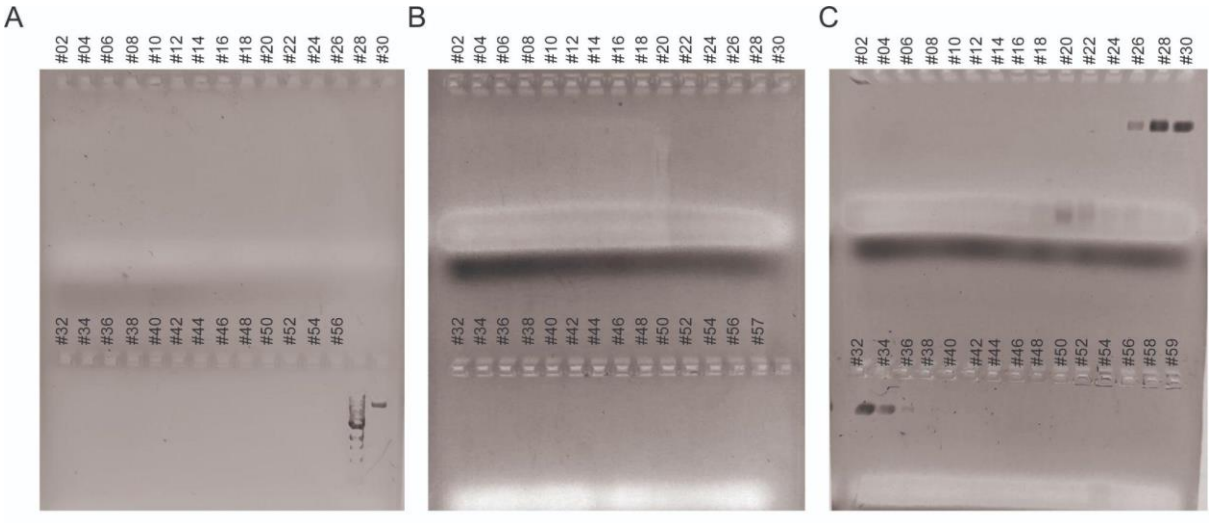


Figura 65. Producción y purificación de las distintas versiones de VLPs AP205 en bacterias *E. coli* C41. Se muestran los geles de agarosa 1% m/v en los cuales se realizó la electroforesis de las distintas fracciones colectadas en la cromatografía de exclusión molecular. **A. Purificación de AP205-CT VLPs. B. Purificación de AP205-BALB2 VLPs. C. Purificación de AP205 WT VLPs.**

Al respecto de la purificación de AP205-CT VLPs, no se puede apreciar en la **Figura 65A,** pero se observó unas bandas muy tenues en las fracciones #22 y #24. Por otro lado, para las AP205-BALB2 VLPs en la **Figura 65B** se observa señal positiva en las fracciones #18 y #20. Para ambos casos se llevó a cabo una tinción de los geles de agarosa con Coomasie Blue, observando proteínas en las calles correspondientes a las de las fracciones mencionadas anteriormente (datos no mostrados). Por último, en la **Figura 65C** con respecto a la purificación de AP205 WT VLPs, se aprecia señal positiva para las fracciones #26, #28, #30, #32, #34 y #36.

Las fracciones indicadas y las impares incluidas en el rango de las mismas fueron reunidas en un mismo tubo y se procedió a llevar a cabo la precipitación de las VLPs, así como la diálisis de las mismas. Los resultados se analizaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida y se muestran en la **Figura 66**.

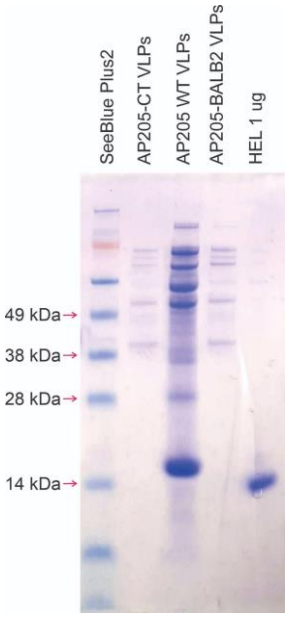


Figura 66. Análisis de las preparaciones de VLPs AP205. Se muestra la electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante de las muestras al finalizar la purificación de las VLPs. En la primera calle se utilizó el marcador de peso molecular SeeBlue Plus2 (ThermoFisher) y en la última calle se utilizó HEL para cuantificar las partículas.

Como se puede observar en la **Figura 66**, no se logró la purificación de AP205-CT VLPs ni AP205-BALB2. Al contrario, se lograron purificar las AP205 WT VLPs, observando la banda proteica a 14 kDa que se corresponde con el monómero de la proteína de cápside AP205.

En función de los resultados obtenidos y considerando que no se optimizaron los codones al solicitar las secuencias sintéticas, se evaluó la expresión y producción de AP205 VLPs utilizando otras cepas de *E. coli* que favorezcan la expresión de proteínas de origen eucariota, como BL21, BL21 *Magic* y Rosetta, cuyos resultados se muestran en la **Figura 67**.

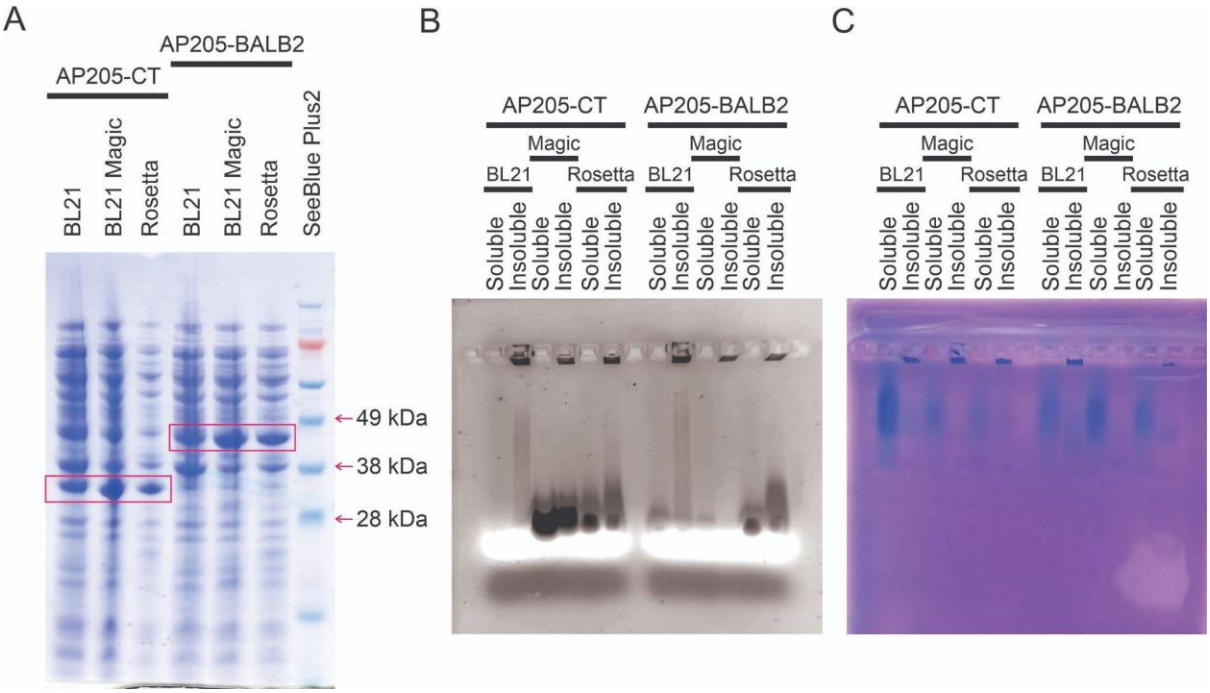


Figura 67. Expresión de VLPs AP205 en bacterias *E. coli* BL21, BL21 Magic y Rosetta. Se muestran las electroforesis en geles de poliacrilamida de lisados bacterianos y geles de agarosa de las fracciones solubles e insolubles derivadas. **A. Patrón de expresión de las proteínas AP205-SAg en tres cepas diferentes.** En la primera calle se utilizó el marcador de peso molecular SeeBlue Plus2 (ThermoFisher). **B. Análisis del material genético en las fracciones solubles e insolubles.** Gel de agarosa 1% m/v donde se realizó la electroforesis de las fracciones solubles e insolubles de los lisados bacterianos de las tres cepas. **C. Análisis de proteínas en las fracciones solubles e insolubles.** Tinción del gel de agarosa con Coomasie Blue para comparar la coincidencia con el material genético.

Como se puede observar en la **Figura 67A**, todas las cepas fueron capaces de expresar las proteínas AP205-CT y AP205-BALB2 en los pesos moleculares esperados (31 kDa y 46 kDa, respectivamente). Sin embargo, al analizar las fracciones solubles e insolubles de cada una mediante electroforesis en geles de agarosa y posteriormente teñidos con Coomasie Blue, se observa que no se corresponden entre las mismas, indicando que las VLPs no se están generando adecuadamente (**Figuras 67B y 67C**).

Considerando que la mejor de las tres cepas de *E. coli* era Rosetta ya que se observa menor *background* y aproximadamente la misma cantidad de proteína expresada, se realizó un último intento en la purificación de las VLPs utilizando dicha cepa. Esto se llevó a cabo utilizando 100 mL de cultivo con los antibióticos correspondientes y durante toda la noche a 37°C. Se avanzó en la purificación de las VLPs de los cultivos expresados, y se sembraron las fracciones solubles e insolubles previas a la precipitación con sulfato de amonio, resultados que se muestran en la **Figura 68**.

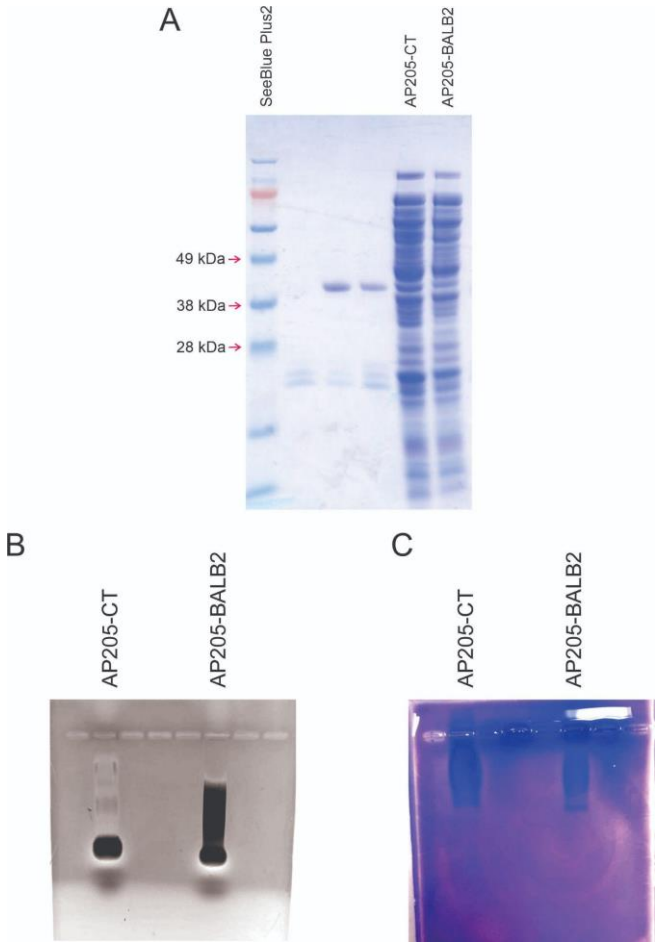


Figura 68. Análisis de la purificación parcial de las VLPs AP205. Las bacterias fueron inducidas, lisadas y su patrón de expresión de proteínas fue analizada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 10% m/v. Se continuó con la purificación de las VLPs y se evaluó la composición de las fracciones previo a la precipitación con sulfato de amonio. **A. Patrón de expresión de las bacterias *Rosetta* inducidas.** En la primera calle se utilizó el marcador de peso molecular SeeBlue Plus2 (ThermoFisher). **B. Análisis del material genético en las fracciones.** Electroforesis en gel de agarosa 1% m/v teñido con bromuro de etidio y revelado con luz UV. **C. Proteínas presentes en las preparaciones finales.** Tinción del gel de agarosa con Coomasie Blue para comparar la coincidencia con el material genético.

Como se puede observar en la **Figura 68A**, no se observa una sobreexpresión en los pesos moleculares esperados. En el caso de AP205-CT se aprecia una banda proteica de escasa intensidad en el peso molecular esperado, por lo que decidió avanzar en la purificación, deteniéndose antes de realizar la cromatografía por exclusión molecular. Los resultados obtenidos de dicha construcción y la muestra de AP205-BALB2 fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa (**Figura 68B**). Nuevamente no se observa material genético íntegro correspondiente al que da lugar a las VLPs, pero sí se encuentra una banda de menor peso molecular, idéntica a la observada en las AP205 WT VLPs (**Figura 63B**). Además, como se aprecia en la **Figura 68C**, al teñir el gel de agarosa con Coomasie

Blue, no hay coincidencia entre las bandas de material genético y las proteínas en las muestras, confirmando que no hay ARN encapsulado correctamente en las preparaciones analizadas.

Vehiculización de BALB2 en nanojaulas sintéticas utilizando el sistema SpyCatcher/SpyTag

Diseño experimental

Al igual que para el sistema AP205, para esta parte del capítulo se utilizaron dos versiones del SAg BALB2, la versión del marco abierto de lectura completo y la versión corta, denominada CT. Un resumen del diseño experimental para la generación de las VLPs quiméricas se muestra en la **Figura 69.**

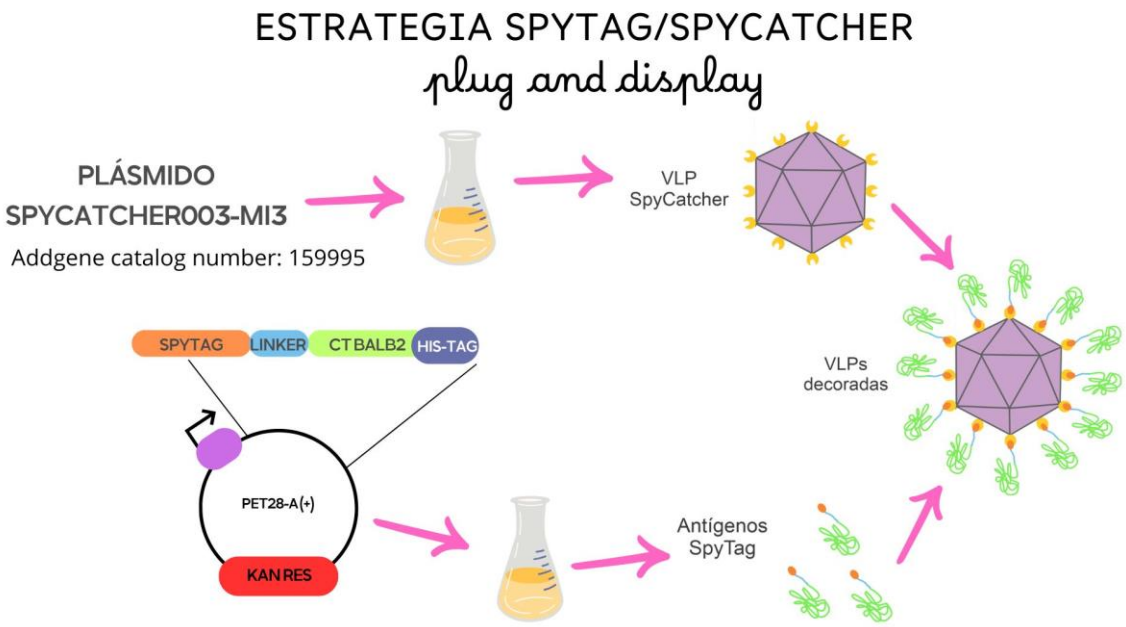


Figura 69. Resumen gráfico de la estrategia *Plug and Display* para la generación de las VLPs quiméricas utilizando el sistema SpyCatcher/SpyTag. Por un lado, deben generarse las VLPs SpyCatcher tras la expresión del plásmido SpyCatcher003-mi3 en bacterias *E. coli* y purificarlas. Por otro lado, se deben producir los antígenos SpyTag expresando los plásmidos pET28-SpyTag-BALB2 y pET28-SpyTag-CT en bacterias *E. coli* y purificarlos. Por último, se debe realizar con conjugación de ambos componentes tras incubación en condiciones determinadas.

Análisis bioinformáticos

Se llevó a cabo el análisis de las secuencias de los plásmidos solicitados para su síntesis utilizando herramientas bioinformáticas. Considerando que dichas secuencias serán expresadas en bacterias *E. coli*, se predijeron los pesos moleculares y otras características de las proteínas, cuyo resumen se muestra en la **Tabla 28**.

Proteína	Peso molecular	Cantidad de aminoácidos	pI	Ubicación intracelular	Solubilidad
SpyCatcher003-mi3	36,0 kDa	341	5.02	Amino terminal interior, 2 hélices transmembrana	0.8555
SpyTag-CT-HT	20,8 kDa	180	9.73	Amino terminal exterior, 0 hélices transmembrana	0.7473
SpyTag-BALB2-HT	35,9 kDa	314	9.70	Amino terminal interior, 1 hélice transmembrana	0.4819

Tabla 28. Resumen de las predicciones bioinformáticas de las proteínas del sistema SpyCatcher/SpyTag. Las primeras 3 columnas fueron determinadas utilizando la herramienta ProtParam, mientras que la presencia de dominios transmembrana fue predicha mediante el uso de HMMTOP y la solubilidad fue determinada utilizando la herramienta NetSolP - 1.0.

Producción, purificación y caracterización de las nanojaulas

Pruebas de expresión a pequeña escala

Para comenzar con la generación de las nanojaulas sintéticas decoradas con las variantes de BALB2 en su superficie, se avanzó en el análisis de la preparación del plásmido SpyCatcher003-mi03 y en la expresión del mismo en bacterias *E. coli* C41, lo que se muestra en la **Figura 70**.

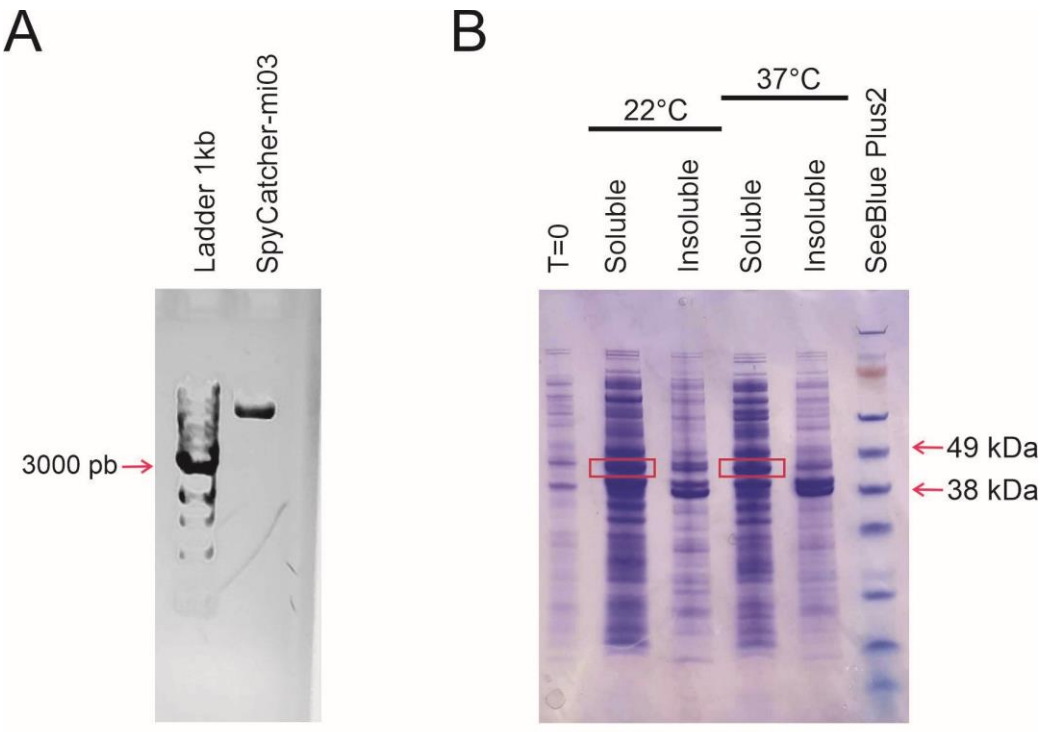


Figura 70. Análisis de la construcción SpyCatcher003.mi3. A. Electroforesis en gel de agarosa del ADN plasmídico purificado. En la primera calle se utilizó el *ladder* 1kb (NEB) para tener referencia del peso molecular. B. **Expresión del plásmido en bacterias *E. coli* C41.** Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante de las fracciones solubles e insolubles en distintas condiciones de expresión. En la última calle se utilizó el marcador de peso molecular SeeBlue Plus2 (ThermoFisher).

Como se observa en la **Figura 70A**, el plásmido recibido tiene el tamaño esperado de 6273 pb. Por otro lado, al hacer pruebas de expresión del plásmido en *E. coli* C41 tanto a 22°C como a 37°C se observa una banda que podría corresponderse con la proteína ya que no se encuentra presente en las bacterias a tiempo cero (**Figura 70B**). Sin embargo, el tamaño no es el esperado, ya que las predicciones bioinformáticas indican que debería tener un peso molecular de 36 kDa. A pesar de ello, al acudir a los trabajos publicados en los cuales se hizo uso de la misma plataforma, se encuentra que se reportó como una banda proteica entre 55 y 35 kDa, con un tamaño aproximado de 42 kDa (Ahmed et al., 2023; Rahikainen et al., 2021; Tan et al., 2021). Además, se observa que a ambas temperaturas la proteína se encontraría en la fracción soluble, como ha sido reportado previamente en esos mismos trabajos.

Producción y purificación de las nanojaulas

Siguiendo con los protocolos indicados por el grupo de investigación que desarrolló las nanojaulas, se procedió a realizar la producción de las mismas en 250 mL de cultivo a 37°C, 200 rpm y expresión durante toda la noche. Los *pellets* bacterianos fueron procesados para purificar las VLPs y se obtuvieron 48 fracciones tras cromatografía de exclusión molecular, que fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y de agarosa (**Figura 71**).

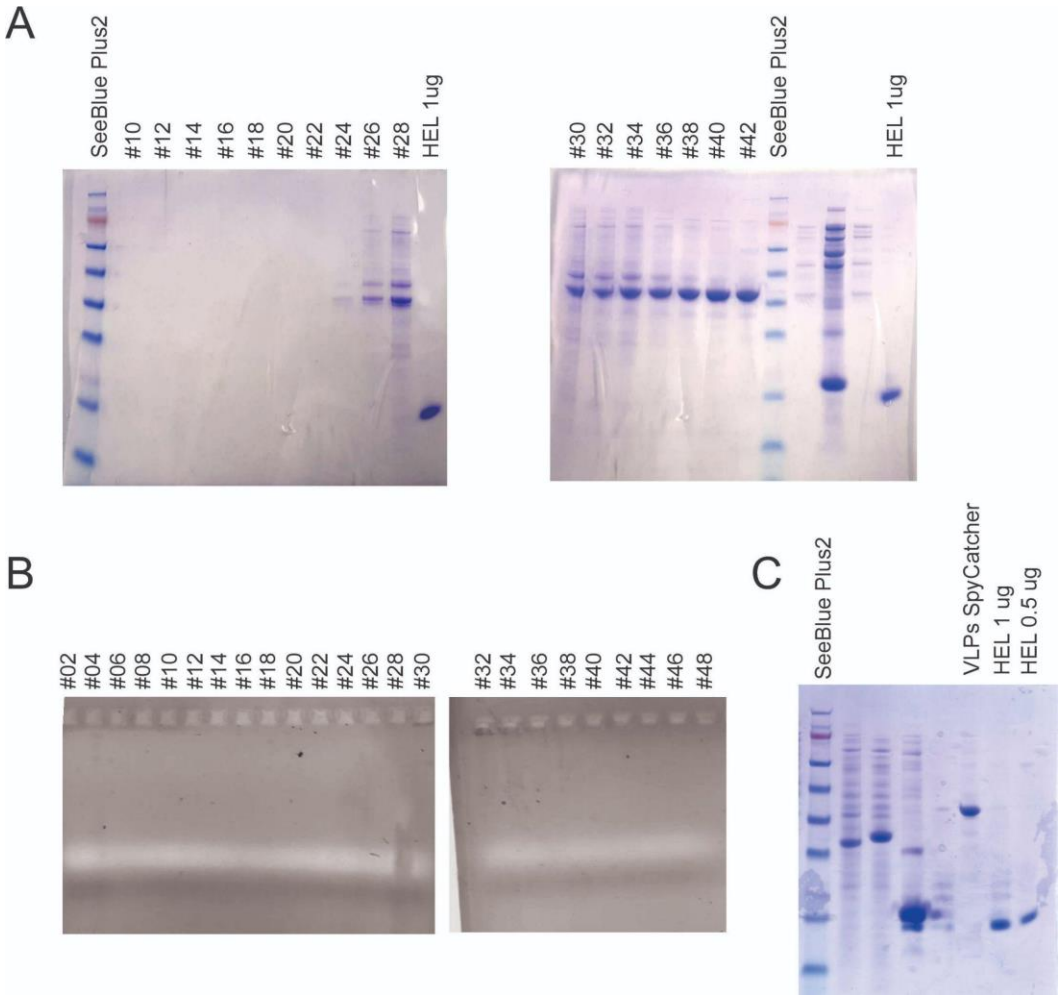


Figura 71. Purificación de VLPs SpyCatcher. A. Análisis de las fracciones purificadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Se analizaron las fracciones pares de la purificación de VLPs SpyCatcher tras la cromatografía de exclusión molecular. En ambos geles se utilizó el marcador de peso molecular SeeBlue Plus2 (ThermoFisher) y la HEL como referencia de cantidad de las partículas. **B. Análisis del material genético presente en las fracciones.** Las fracciones pares fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa 1% m/v teñidos con bromuro de etidio y revelados mediante transiluminación UV. **C. Preparación de VLPs depletadas de LPS.** La preparación fue sometida a electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante. En la primera calle se utilizó el marcador de peso molecular SeeBlue Plus2 (ThermoFisher) y en las últimas dos, distintas concentraciones de HEL como referencia de cantidad de las partículas.

Como se muestra en la **Figura 71A**, se lograron purificar las SpyCatcher VLPs, observando señales desde la fracción 26 hasta la fracción 42. En ese sentido, el método de purificación utilizado es el adecuado, pero además hubiera sido ideal haber recolectado más fracciones, ya que la última utilizada fue positiva. En este sentido, obtener las fracciones purificadas permiten confirmar que las bandas proteicas observadas en la **Figura 71** efectivamente se corresponden con la sobreexpresión de las SpyCatcher VLPs. Por otro lado, al contrario de lo que se observa con las VLPs derivadas de bacteriófagos como AP205, las VLPs

SpyCatcher no portan ARN empaquetado, lo que se verifica por la ausencia de material genético en todas las alícuotas analizadas mediante electroforesis en geles de agarosa (**Figura 71B**). De acuerdo con la información disponible, dichas VLPs poseen un diámetro aproximado de 37.2 nm, comparando con las Qβ VLPs que tienen un tamaño de 30 nm. Considerando los protocolos estandarizados del laboratorio se espera que las VLPs derivadas de bacteriófagos se encuentren entre las fracciones de elución #10 y #30. En el caso de las VLPs SpyCatcher al ser de mayor tamaño, deberían tener menos tiempo de retención, al contrario de lo observado en la **Figura 71A**. Sin embargo, lo que ocurrió es que la columna estaba parcialmente ocluida por lo que las alícuotas de elución eran de mucho menos volumen que el esperado.

En función de los resultados obtenidos, se continuó con la purificación de las nanojaulas juntando desde la fracción 28 hasta la fracción 48 y utilizando un concentrador de *cutoff* 100 kDa. Posteriormente se llevaron a cabo dos pasos de diálisis contra PBS 1X. Dado que para ser utilizada en formulaciones para su inmunización de ratones hay que evitar la presencia de endotoxina, se procedió a depletar el LPS de la preparación y los resultados fueron analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (**Figura 71C**). Se observa que no se perdió mucho material de las VLPs tras el protocolo aplicado, pero además utilizando como referencia la HEL, se puede aproximar que la concentración de las VLPs limpias de LPS poseen 1 μg/μL.

A continuación, se decidió analizar las VLPs SpyCatcher mediante microscopía electrónica de transmisión, cuyos resultados se muestran en la **Figura 72**.

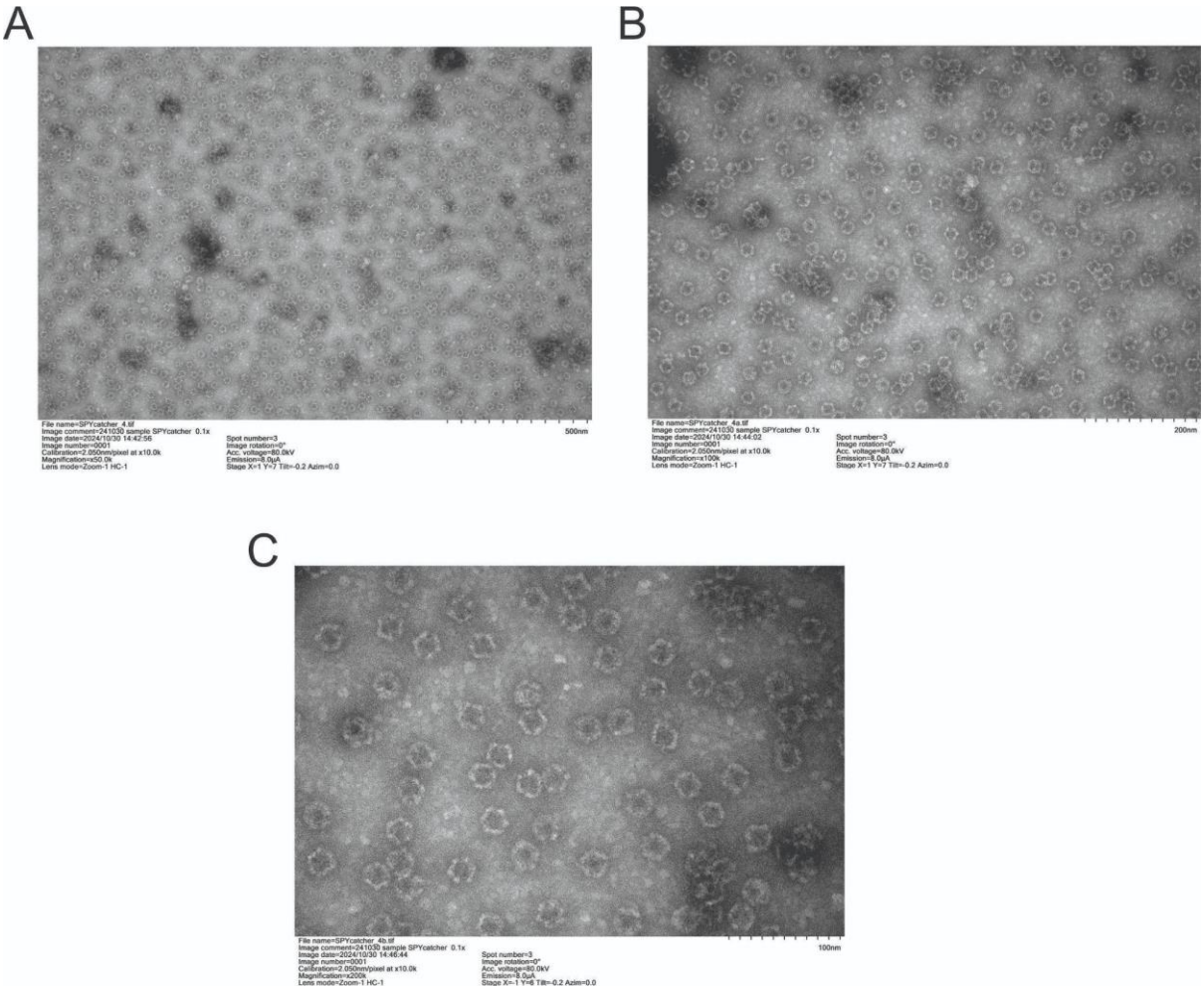


Figura 72. Imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión de las VLPs SpyCatcher. Se muestran imágenes del mismo campo utilizando distintos objetivos. En A. se utilizó el objetivo 50X, en B. se utilizó el objetivo 100X y en C., el 200X**.** Como referencia de tamaño a la derecha debajo de cada imagen se muestra una barra.

Como se puede observar en la **Figura 72**, el diámetro aproximado de las VLPs es entre 30/40 nm, congruente con lo reportado en los trabajos publicados al respecto. Asimismo, se puede observar la estructura geométrica de las nanojaulas, encastradas entre sí, con tamaño y forma homogénea. A diferencia de las VLPs de bacteriófagos se encuentra que estas partículas no poseen contenido, confirmando la ausencia de material genético dentro de las mismas (Dika et al., 2011). Las alícuotas de las VLPs analizadas fueron conservadas a -20°C hasta ser utilizadas.

Expresión, producción y purificación de los antígenos

Pruebas de expresión a pequeña escala

Una vez recibidas las construcciones pET28-BALB2 y pET28-CT las mismas fueron transferidas a *E. coli* 10G a partir de las cuales se realizaron diversos cultivos bacterianos y

posteriores extracciones de ADN plasmídico. El material genético purificado se muestra en la **Figura 61A**, donde se verifica que el plásmido que porta el marco abierto de lectura de BALB2 tiene un peso molecular mayor que CT. Dichas construcciones fueron transferidas a bacterias *E. coli* C41 y se llevaron a cabo pruebas de expresión en condiciones estándar durante 2 horas. Adicionalmente se evaluó la expresión en bacterias *E. coli* Rosetta y ambos resultados se muestran en la **Figura 73**.

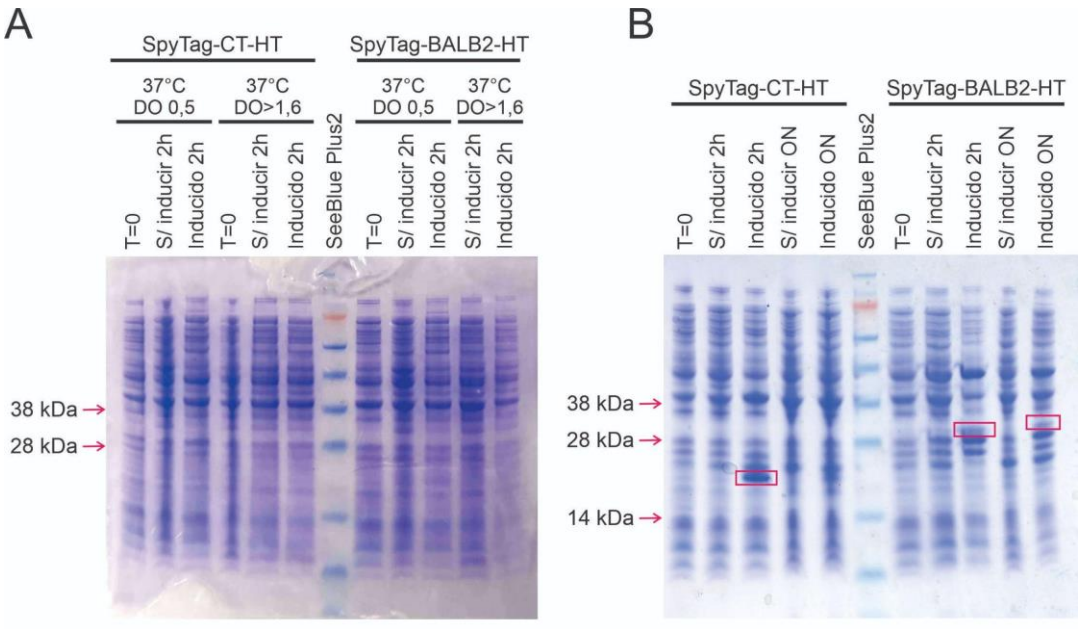


Figura 73. Pruebas de expresión de los SpyTag-SAgs. Los lisados de las bacterias expresando las distintas construcciones fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes, con posterior tinción con Coomassie Blue. **A. Expresión en bacterias *E. coli* C41.** Se muestran los patrones de expresión de proteínas en distintas condiciones para cada una de las construcciones. En la calle número 7 se utilizó el marcador de peso molecular SeeBlue Plus2 (ThermoFisher). **B. Expresión en bacterias *E. coli* Rosetta.** Se muestran los patrones de expresión de proteínas en distintas condiciones para cada una de las construcciones. En la calle número 7 se utilizó el marcador de peso molecular SeeBlue Plus2 (ThermoFisher). En los recuadros rosas se muestran las bandas proteicas que podrían corresponderse con las proteínas de fusión esperadas.

Como se puede apreciar en la **Figura 73A**, no se pudo observar expresión de las proteínas en bacterias *E. coli* C41. Esto es consistente con lo observado para el sistema AP205 ya que para generar las construcciones en pET28 tampoco se optimizaron los codones. En ese sentido, se avanzó en la expresión de las proteínas en bacterias *E. coli* Rosetta, logrando observar bandas que podrían corresponderse con las mismas ya que se encuentran cercanas a los pesos moleculares esperados (**Figura 73B**).

Optimización de la purificación

Una vez seleccionada Rosetta como cepa de expresión, se comenzaron a analizar las condiciones del protocolo de purificación, comenzando por determinar la solubilidad de las proteínas, como se muestra en la **Figura 74**. En dicha figura además se muestra una prueba del efecto del DTT en la solubilidad de las proteínas.

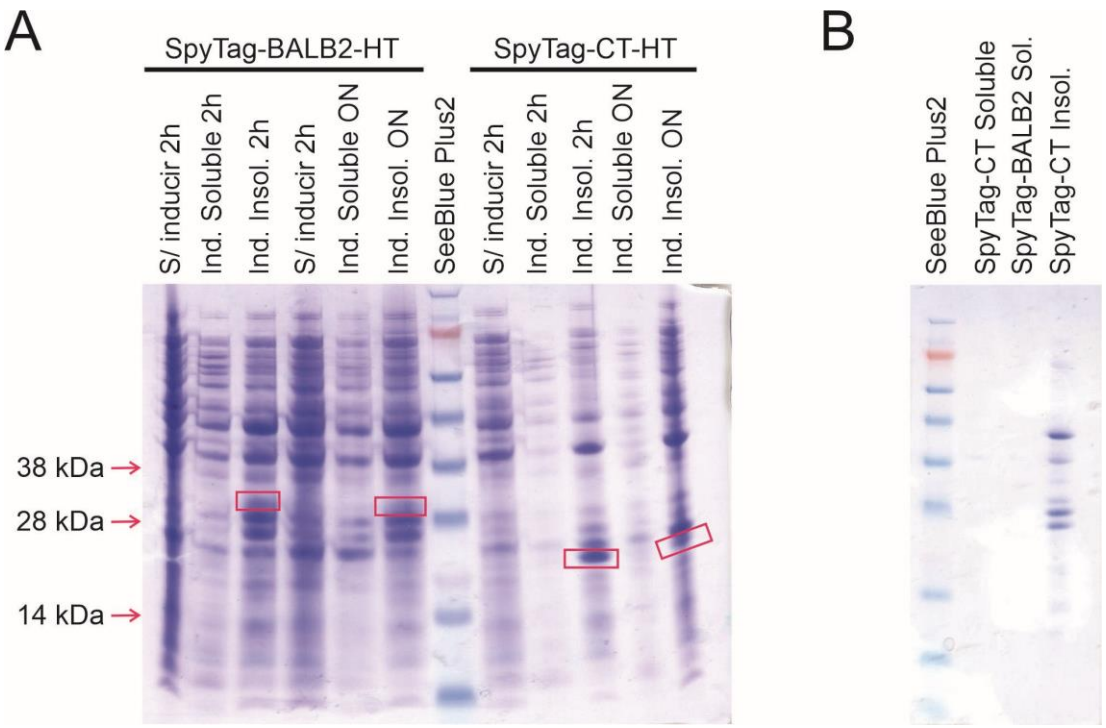


Figura 74. Optimización de la purificación de las proteínas SpyTag-SAg. Electroforesis en geles de poliacrilamida 10% m/v desnaturalizantes. **A. Análisis de la solubilidad de las proteínas.** Para cada proteína se muestran las fracciones solubles e insolubles de la expresión de las construcciones en distintas condiciones. En la calle número 7 se utilizó el marcador de peso molecular SeeBlue Plus2 (ThermoFisher). Los recuadros rosas muestran las bandas proteicas que se podrían corresponder con cada una de las proteínas esperadas. **B. Evaluación del efecto del DTT en la solubilidad de las proteínas.** A las proteínas ya resuspendidas en *buffer* sin DTT se les adicionó dicho reactivo y se separaron las fracciones solubles e insolubles de cada muestra. En la primera calle se utilizó el marcador de peso molecular SeeBlue Plus2 (ThermoFisher).

Como se puede observar en la **Figura 74A**, las proteínas expresadas en cualquier condición utilizando la cepa Rosetta se encuentran en la fracción insoluble. Por otro lado, al adicionar DTT a las bacterias lisadas, no se favorece la solubilización de los mismos, ya que permanecen en la fracción insoluble, como se observa en la **Figura 74B**.

Expresión a mediana escala y purificación

Se produjeron 100 mL de cultivos líquidos de *E. coli* Rosetta portando las construcciones pET28-BALB2 y pET28-CT, expresando durante 2 horas a 37°C en agitación de 200 rpm. Se llevó

a cabo la purificación como se describió anteriormente, las fracciones insolubles fueron resuspendidas en un *buffer* con urea 8M y posteriormente se obtuvieron las fracciones solubles, cuyo patrón de expresión de proteínas se muestra en la **Figura 75**.

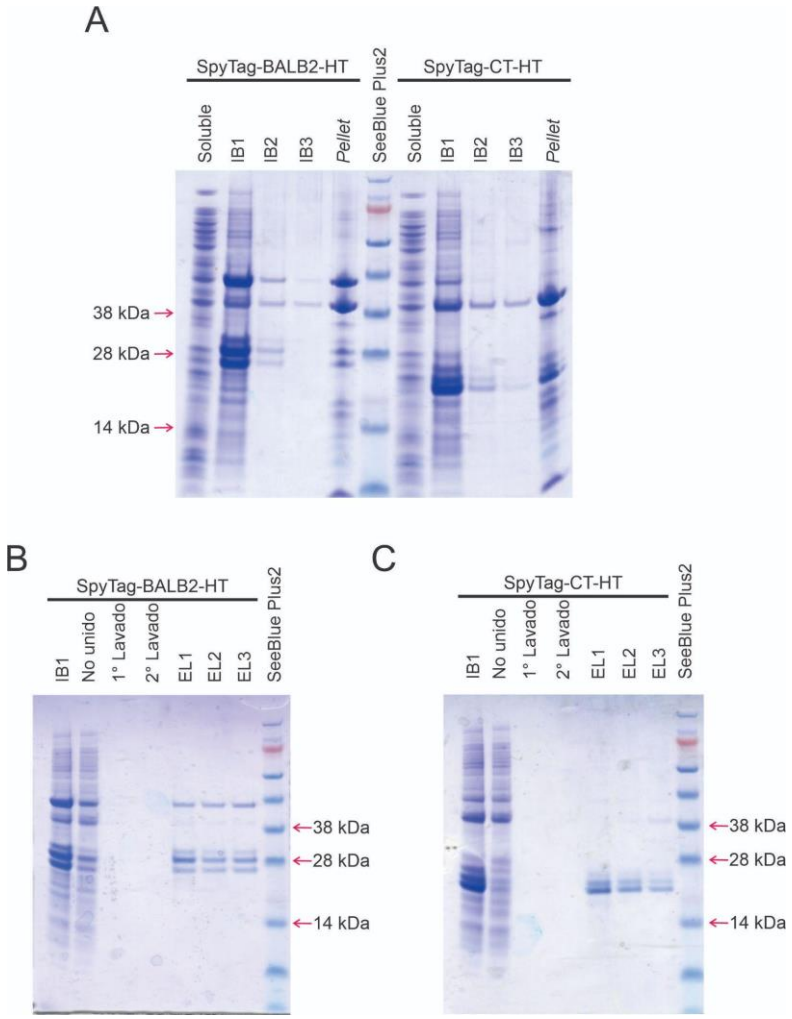


Figura 75. Solubilización, ruptura de los cuerpos de inclusión y purificación de las proteínas SpyTag-SAg. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes de las muestras derivadas de la purificación de las proteínas. Como referencia del peso molecular se utilizó el marcador de proteína SeeBlue Plus2 (ThermoFisher). **A. Solubilización de los cuerpos de inclusión.** Se evaluaron los patrones de expresión de proteínas de distintas muestras del proceso de solubilización utilizando un *buffer* con urea 8M. **B. Purificación de SpyTag-BALB2-HT. C. Purificación de SpyTag-CT-HT.**

Como se puede observar en la **Figura 75A**, las proteínas se encuentran mayoritariamente en la fracción IB1. Como consecuencia, dichas alícuotas fueron utilizadas para purificar las proteínas mediante cromatografía de pseudoafinidad utilizando resinas de níquel. En relación a la purificación de SpyTag-BALB2-HT, se puede observar que logró ser eluida en las tres fracciones (**Figura 75B**). Con respecto a SpyTag-CT-HT, se puede observar lo mismo que para la otra proteína, pero además hay una pequeña fracción de la proteína

que no se adhirió a la matriz y se encuentra en la fracción no unida (**Figura 75C**). En términos generales se puede observar una baja concentración de los antígenos, ya que en cada calle se sembraron 7,5 µL de las muestras. Además, se puede observar una diversidad de bandas, que podría explicarse por la presencia de urea en las muestras y el calentamiento de las mismas en la preparación para la electroforesis (Kurien & Scofield, 2012).

La alícuota IB1 de cada una de las construcciones fue sometida a diálisis en dos pasos, tomando muestra a las 2 horas y a tiempo final (durante toda la noche). En ninguna de las dos instancias se observó un precipitado, pero sí se observó turbidez de las soluciones, por lo que fueron resuspendidas mediante el uso de una micropipeta y en función de una colaboración con la Dra. Mónica Rosas del Departamento de Microbiología y Biología Molecular, se decidió adicionar glicerol a las muestras, para favorecer la solubilidad.

Conjugación de antígenos a las nanojaulas

Una vez obtenidas por separado las VLPs SpyCatcher y los antígenos SpyTag, se procedió a llevar a cabo la conjugación de ambas partes para lograr las VLPs decoradas, resultados que se muestran en la **Figura 76**.

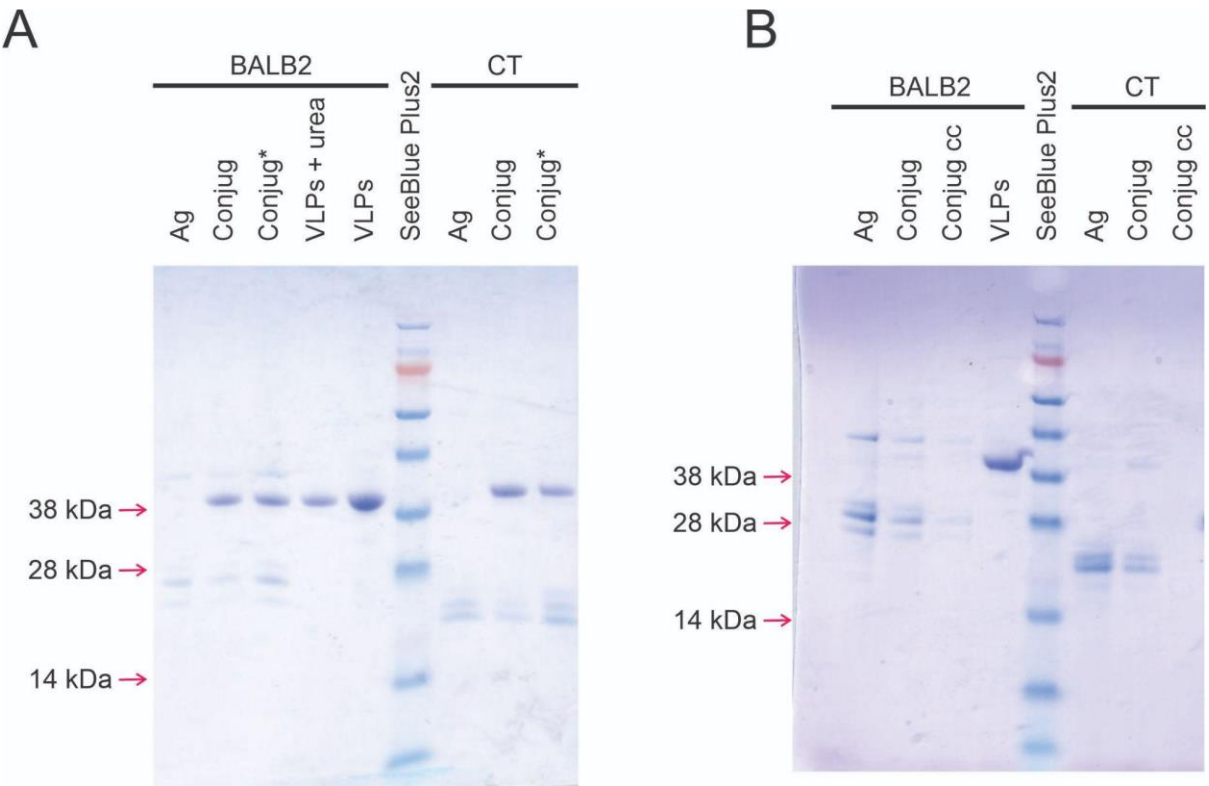


Figura 76. Conjugación de VLPs SpyCatcher con los antígenos SpyTag-SAgs. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes utilizando las muestras conjugadas, así como cada uno de los componentes por separado. Se utilizó el marcador de peso molecular SeeBlue Plus2 (ThermoFisher). **A. Primer intento de conjugación.** Las calles marcadas con un * se corresponden con las conjugaciones realizadas entre las VLPs y los antígenos dializados durante toda la noche, en

contraste con las otras conjugaciones en los cuales se utilizaron los antígenos dializados por 2 horas. Además, se analizó el efecto de la urea y el glicerol sobre las VLPs solas, que se muestra en la calle 4. **B. Segundo intento de conjugación.** Las calles denominadas "cc" se corresponden con conjugaciones que luego de juntar ambos componentes fueron concentrados utilizando centricones de distintos *cutoff*, siendo de 14 y 10 kDa respectivamente.

Considerando que los antígenos fueron resuspendidos en urea y posteriormente dializados, se evaluó el efecto de la diálisis en la reacción de conjugación, como se muestra en la **Figura 76A**. Los resultados esperados en caso que se genere la conjugación es que aparezca una especie de un tamaño molecular sumado entre las VLPs y los antígenos que sería de 58 kDa (36 kDa+20,8 kDa) en el caso de SpyTag-CT y de 72 kDa (36 kDa+35,8 kDa) para SpyTag-BALB2. Como se puede observar en la **Figura 76A**, no se lograron observar en ningún caso las especies conjugadas.

Como los antígenos se encuentran muy diluidos, se intentó concentrar los mismos una vez mezclados en el mismo tubo, lo que se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes como se muestra en la **Figura 76B**. Al respecto, se puede indicar que tampoco se pudo lograr la conjugación ante la falta de detección de la especie conjugada con alto peso molecular. Esto podría explicarse por la baja concentración de los antígenos. Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que las condiciones de conjugación no sean adecuadas, e incluso que la presencia del glicerol o la urea afecten dicha reacción. Por otro lado, al concentrar las mezclas, se observa que se pierden las proteínas de la muestra, resultando inadecuado para disminuir el volumen de la mezcla ya que, al estar desnaturalizadas, aparentemente escapan por los poros de las membranas utilizadas.

CONCLUSIONES

En este capítulo se describen los resultados obtenidos para el diseño, clonado, expresión y vehiculización de dos variantes del SAg BALB2 utilizando sistemas de expresión bacterianos.

Comenzando con el sistema AP205 se logró diseñar, construir las herramientas de vehiculización y expresar las proteínas de fusión de la cápside con las dos variantes de BALB2 utilizando las cepas BL21, BL21 *Magic* y Rosetta. Al avanzar en la producción y purificación de las VLPs utilizando la cepa Rosetta, se encontró que no fue posible obtener las partículas encapsulando adecuadamente el ARN. En este sentido, el impedimento probablemente sea estérico, ya que el tamaño de los antígenos a vehiculizar casi duplica el peso molecular de la proteína de cápside de AP205.

Con respecto a la generación de VLPs quiméricas utilizando el sistema SpyCatcher/SpyTag se logró por un lado la producción, purificación y caracterización de las VLPs SpyCatcher. Los resultados obtenidos para dichas partículas se condicen con trabajos relacionados publicados, en relación al peso molecular de las bandas de expresión, el tamaño de las partículas y los protocolos utilizados. Por otro lado, se logró la expresión de los SpyTag-SAgs utilizando las bacterias *E. coli* cepa Rosetta, y también se logró producir y purificar dichas proteínas en forma soluble. Es necesario continuar optimizando la conjugación para obtener las VLPs quiméricas finales.

SECCIÓN IV: CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y MATERIAL COMPLEMENTARIO

CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las leucemias y los linfomas no Hodgkin fueron la décima y onceava causa de muerte global relacionada con cáncer en el año 2022. El 54% de los casos de leucemias agudas se encuentran en pacientes menores de 20 años, y la LLA representa un 75-80% de todos los casos de leucemia en pacientes pediátricos, siendo la causa principal de muerte en dicha población. Como consecuencias, ambas patologías componen una preocupación en la salud pública, particularmente en países de bajos a medianos ingresos, donde ocurren el 94% de las muertes mundiales relacionadas con leucemia. En Argentina, entre los años 2000 y 2013, se reportaron 18.069 casos de cáncer en niños y niñas menores de 15 años de edad. La sobrevida estimada a los 5 años del diagnóstico para el período 2000-2009 fue del 60% para las leucemias y del 74% para los linfomas. Los niños y niñas menores de un año poseen el peor pronóstico, con una sobrevida a 36 meses del diagnóstico del 36%.

La propuesta terapéutica actual logra que el 90% de los pacientes ingresen en remisión de la enfermedad, pero causan toxicidades en forma aguda y tardía. Además, tiene un éxito relativamente bajo para tratar las recaídas, lo que implica una expectativa de supervivencia inferior al 25%. En consecuencia, resulta necesaria la implementación de terapias eficaces, específicas y seguras para mejorar el pronóstico de los pacientes con leucemias y linfomas T.

En la actualidad hay varias investigaciones enfocadas en el desarrollo de terapias novedosas, más específicas y con menores efectos adversos, utilizando tecnologías de última generación. Si bien dichos desarrollos son prometedores, al tratarse de enfoques personalizados en el paciente, son tecnologías de alto costo y complejidad. Además, el acceso a dichas terapias puede ser dificultoso en algunas regiones como nuestro país y en los últimos años se han reportado evidencias de resistencias secundarias que podrían estar relacionadas a dichos tratamientos.

Los superantígenos de origen viral poseen una limitada descripción al respecto tanto de su estructura, como los mecanismos mediante los cuales actúan y su impacto en la salud humana. El auge de la investigación con SAgs virales ocurrió desde el año 1992 hasta el 2001, año a partir del cual comenzaron a disminuir las publicaciones por debajo de los 40 anuales. La falta de información y de interés al respecto causa que no haya proyectos que involucren su uso para el desarrollo de herramientas potencialmente terapéuticas. En este sentido, es necesario resignificar los conocimientos obtenidos mediante la investigación básica para resolver problemas. Una de las dificultades al respecto es la falta de conocimiento detallado sobre las respuestas inmunológicas celulares, lo cual se convierte en un impedimento para la caracterización del mecanismo de acción de los superantígenos.

En este contexto, el objetivo de este trabajo fue investigar el potencial de los superantígenos virales de MMTV en el desarrollo de un posible tratamiento de leucemias y linfomas de linfocitos T, con el fin de explorar nuevas estrategias terapéuticas que puedan

reducir los efectos secundarios de los tratamientos convencionales. Específicamente, hemos trabajado en el desarrollo y la evaluación de distintas estrategias de expresión de SAgs del MMTV utilizando sistemas heterólogos.

Inicialmente, en el **Capítulo III** hemos caracterizado la respuesta celular *in vivo* de las $VLPs_Z$ utilizando la proteína eGFP. En el marco de la presente tesis doctoral, resulta de gran relevancia describir las respuestas inmunológicas tras la inyección de las $VLPs_Z$ en organismos tales como los ratones. Para nuestro grupo de trabajo fue particularmente importante poder asegurar que las partículas no inducían toxicidad y por lo tanto podrían ser seguras para desarrollos posteriores. Por otro lado, al proponer a las $VLPs_Z$ como una plataforma para el desarrollo de vacunas, era necesario determinar la eficacia de inducir respuestas inmunológicas. En este sentido, las $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ fueron utilizadas en carácter de una prueba de concepto, para luego poder utilizar dichas partículas como plataformas para la presentación de antígenos heterólogos. Se pudo comprobar que las vesículas son capaces de inducir memoria celular, logrando respuesta específica contra el antígeno que estaba siendo vehiculizado dentro de las VLPs. Además, hemos encontrado que las plataformas estimulan eficientemente tanto las respuestas humorales como celulares observando que gran cantidad de células muestran marcadores de activación tanto en el bazo como en ganglios linfáticos regionales, tales como linfocitos T $CD4^+$, $CD8^+$ y linfocitos B $CD19^+$. Esto ocurre en ausencia de adyuvantes lo que aporta a la versatilidad de dichas plataformas, ampliando las posibilidades para su administración. Esto es particularmente relevante para los desarrollos terapéuticos que se proponen en la presente tesis, donde la inyección intravenosa podría ser una posibilidad atractiva, ya que se administraría en forma localizada donde se encuentran las células leucémicas. Sumado a esto, las VLPs han demostrado su capacidad de inducir una respuesta inmune a bajas dosis, lo que puede reducir considerablemente los costos de inmunización y en comparación con otros sistemas reportados ofrece una mejor vehiculización de antígenos por µg de partículas (Molinari et al., 2014).

Como se indicó en la introducción, la plataforma de vehiculización de antígenos ha sido explorada para el desarrollo de diversos candidatos vacunales y otros más se encuentran planificados para continuar su caracterización. Un ejemplo de ello es el uso de la proteína NS1 de los flavivirus para prevenir enfermedades de importancia sanitaria regional como Dengue, Fiebre Amarilla, Zika, *West Nile* y encefalitis de Saint Louis. En ese sentido, se ha podido lograr la expresión de pZ-NS1 en células y la generación de las primeras $VLPs_{Z\text{-}NS1}$ (datos no publicados). Por otro lado, si bien actualmente existe una vacuna preventiva contra la FHA, que es la cepa Candid #1 atenuada, se podría evaluar si la construcción de las $VLPs_Z$ es capaz de inducir protección en organismos inmunizados que no pueden vacunarse con dicha formulación, como las personas con compromiso del sistema inmunológico. Más aún,

como se evidenció durante los eventos de emergencias sanitarias como COVID-19 o la epidemia de dengue en los últimos años, contar con plataformas versátiles para el desarrollo de vacunas sirve para prevenir los cuadros graves y mitigar la propagación y expansión de diversas enfermedades.

Para poder seguir indagando en la capacidad de este modelo en el marco del desarrollo de formulaciones con aplicaciones en el campo de la salud, se reemplazó la proteína indicadora por cuatro variantes de SAgs del MMTV considerando un abordaje terapéutico. Los antecedentes del IMEX al respecto muestran que los SAgs de MMTV poseen una actividad linfotóxica T específica y por lo tanto se hipotetizó que los mismos podrían componer una formulación con fines terapéuticos donde las células cancerosas sean linfocitos T, tales como los linfomas y las leucemias. Los antecedentes muestran que el uso del virus entero transportado en la leche murina induce efectos de depleción completa de los clones reactivos, a pesar que se sabe que dicho efecto se debe al SAg. Empleando un abordaje biotecnológico, se propuso la vehiculización de cuatro SAgs del MMTV en $VLPs_Z$ utilizando la transfección de células HEK 293T con los plásmidos pZ-SAgs. La aproximación utilizada para la construcción de las plataformas se detalla en el **Capítulo IV**, logrando obtener los fragmentos de cada una de las variantes propuestas y los clonados finales. A pesar de las limitaciones iniciales de no contar con la información total de las secuencias, al lograr los clonados se pudieron confirmar las identidades de los marcos abiertos de lectura involucrados tras secuenciación. Tras el análisis de las secuencias mediante el uso de herramientas bioinformáticas se lograron predecir diversas características de interés para las proteínas recombinantes, productos de la expresión de las construcciones en los dos sistemas heterólogos planteados. Las secuencias obtenidas tienen entre 837 y 969 pb de longitud, y se ha predicho que no poseen regiones transmembrana *per se*. Resulta particularmente relevante haber logrado obtener la secuencia nucleotídica completa del SAg LA, cuya secuencia en bases de datos se encontraba incompleta (542 pb contra 858 pb).

Mediante el análisis bioinformático se pudo observar que los cuatro SAgs tenían una gran conservación de secuencia en la región 5', mientras que la región de 3' es una zona polimórfica. Sería interesante contar con las estructuras cristalizadas de dichas proteínas o algunas similares, con la finalidad de analizar si los cambios de secuencias impactan efectivamente en la estructura de las mismas. Con las herramientas actuales nuestra única alternativa es un abordaje utilizando algoritmos de *Machine Learning* como *Alpha Fold* (Jumper et al., 2021), lo cual está planteado para ser desarrollado durante el seminario de la est. Ornella Flores.

Utilizando las construcciones logradas pET28-SAgs, nos propusimos la producción y purificación de las cuatro variantes de los SAgs-HT para ser utilizados posteriormente como controles no vehiculizados en los ensayos pautados de actividad biológica. Para ello, se utilizó

un diseño que permitió la que los ORF de los SAgs se mantengan fusionados con un *tag* de histidinas para facilitar su purificación. Utilizando la cepa *E. coli* Rosetta se pudo lograr la expresión de las cuatro variantes de SAgs-HT y se seleccionaron las condiciones óptimas: 37°C, inducción con IPTG 1mM, 200 rpm de agitación y 2 horas de expresión. Las proteínas BALB2-HT y BALB14-HT demostraron ser particularmente sensibles, sea a degradación o inestabilidad, ya que a las 4 horas de expresión desaparecía la banda proteica correspondiente a las mismas. En ese sentido, nos hemos propuesto continuar analizando las secuencias de las mismas para poder identificar si hay diferencias a nivel aminoacídico que cause lo observado. Por otro lado, se pudo comprobar la identidad de todas las proteínas al realizar inmunodetección utilizando un anticuerpo monoclonal contra el *tag* de histidina únicamente en los cultivos inducidos y no en aquellos sin inducir. Comparando los resultados *in silico* con los hallazgos empíricos se puso en evidencia que los SAgs-HT expresados en bacterias tienen exactamente el peso molecular esperado para los mismos, evidenciando la ausencia de modificaciones postraduccionales.

Al avanzar en la caracterización de las proteínas se encontró que todas son insolubles en las condiciones ensayadas, reforzando los resultados obtenidos mediante el uso de herramientas bioinformáticas. Se produjo una de sus variantes (mtv-7-HT) a mediana escala, se fraccionaron los cuerpos de inclusión y se solubilizaron en un *buffer* con urea 8M. La purificación utilizando la columna de níquel fue exitosa, logrando eluir con una buena pureza la proteína esperada. Se realizaron varios intentos de obtención de la proteína mtv-7-HT en su forma soluble mediante diálisis, pero todos fueron infructuosos Ante la falta de soluciones al respecto, se evaluó si el agregado de un *buffer* con pH distinto al de elución puede modificar el estado de solubilidad de la proteína, observando un leve aumento de la solubilidad al diluir 1/10 con *buffer* pH 2.

Al respecto, es necesario continuar optimizando la purificación de los SAgs-HT, proponiendo como último recurso la dilución directa de dicha preparación en los pocillos con células con el fin de poner a prueba si efectivamente poseen alguna actividad biológica. En ese sentido, la labor será continuada en el marco del seminario de la est. Ornella Flores. Por otro lado, se propone por ejemplo realizar un cambio del vector de expresión, como ha funcionado en otras oportunidades (Francis & Page, 2010). Además, podría analizarse la modificación de las secuencias obtenidas a fin de que sean más estables (Magliery, 2015).

Mientras continuábamos optimizando la obtención de los SAgs-HT en forma soluble, avanzamos en el uso de las construcciones pZ-SAgs para expresar y producir las $VLPs_{Z\text{-}SAgs}$ en células HEK293T. Se pudo comprobar su expresión mediante *Western Blotting* utilizando un suero policlonal contra la proteína Z de JUNV. A pesar de ello, se notó una evidente diferencia entre los resultados *in silico* y los hallazgos empíricos ya que los Z-SAgs demostraron un peso molecular menor al esperado. Esto podría deberse a los cambios post-

traduccionales que aporta este sistema, pudiendo ser mediados por proteasas tales como la furina y otras modificaciones desconocidas hasta el momento. En ese sentido, el sistema de expresión y producción sería el más cercano al que ocurre en ratones ya que cuenta con todas las modificaciones post-traduccionales requeridas y es uno de los pocos reportes de la expresión de SAgs del MMTV en sistemas eucariotas (Metzner et al., 2006; Y. Wang et al., 2004). Sería interesante continuar la labor ahondando en los pormenores de las modificaciones post traduccionales de los SAgs y su impacto en la funcionalidad. Un abordaje posible sería continuar caracterizando el sistema de expresión con otros anticuerpos que permitan la detección de diversas secciones de los SAgs y así tener la doble detección, lo que aún no fue posible por falta de los reactivos requeridos. Otra alternativa posible sería realizar una secuenciación de los péptidos para caracterizar su composición aminoacídica.

Considerando la expresión de los SAgs en dos sistemas de expresión (bacterias y células HEK293T), podríamos discutir que son proteínas problemáticas para trabajar. Mientras que al expresarlas en sistemas bacterianos se encuentran insolubles, al analizar su expresión en sistemas eucariotas se observa una variación de sus tamaños que aún no podemos explicar considerando la información disponible. Podría ser posible que la naturaleza compleja de dichas proteínas sea por un lado la causa de las complicaciones técnicas que implica realizar abordajes biotecnológicos al respecto, pero como consecuencia sea la razón por la cual tienen actividades biológicas tan particulares. En este sentido nos preguntamos si la modificación de determinados aminoácidos permitirá por un lado que los mismos conserven la funcionalidad, pero a su vez puedan facilitarse las condiciones de obtención utilizando sistemas heterólogos.

Una vez obtenidas algunas preparaciones de $VLPs_{Z\text{-}SAgs}$, en el **Capítulo V** se muestran los experimentos en los cuales se evaluó la actividad biológica preliminar *in vitro* utilizando muestras de sangre de 2 voluntarios sanos. Considerando las limitaciones del modelo utilizado, se pudo observar que ninguna de las $VLPs_{Z\text{-}SAgs}$ fue capaz de inducir proliferación a los 6 días de cocultivo, aunque se observó una tendencia hacia la inducción de una mayor muerte celular en comparación con el control. En uno de los dos ensayos utilizando la muestra del dador 1, se encontró que las $VLPs_{Z\text{-}mtv\text{-}7}$ fueron las que causaron una mayor proporción de células muertas a los 6 días de cocultivo, lo que podría explicarse tanto por la amplia acción del SAg que se vehiculiza, así como por el repertorio particular de dicho dador. Al respecto, se puede considerar que al utilizar muestras de voluntarios sanos no hay ningún clon sobrerrepresentado, como sí ocurre en las personas con diagnóstico de leucemias y linfomas. Esto podría entonces disminuir el efecto observado, especialmente cuando se compara con los trabajos publicados en los cuales se utilizaron células leucémicas. Las tendencias observadas deben ser puestas a prueba con un mayor número de muestras y son preliminares, pero sientan las bases para ensayos posteriores. Además, no permiten hacer

una prueba de la hipótesis planteada en la presente tesis pero representan la aproximación a nuestro alcance para la evaluación del efecto terapéutico. A futuro se plantea repetir la metodología, utilizando células transformadas y con un enriquecimiento en linfocitos T, como ocurre en el caso de las leucemias y los linfomas.

Al comparar los resultados observados entre las $VLPs_{Z\text{-}eGFP}$ y las $VLPs_{Z\text{-}SAgs}$, se podría discutir sobre la diferencia de las respuestas biológicas observadas con tan solo cambiar el antígeno vehiculizado. Será necesario realizar más ensayos al respecto, pero esto podría implicar que la plataforma sea particularmente versátil con diversos objetivos, sea para causar inmunomodulación o terapias y dependiente en parte del antígeno vehiculizado.

Adicionalmente, considerando la hipótesis de trabajo de la presente tesis, nos propusimos el desarrollo inicial de un protocolo para la caracterización del repertorio de linfocitos T en muestras humanas mediante PCR tiempo final. En el marco del presente trabajo se espera poder caracterizar la especificidad clonal de las células respondedoras ante los distintos tratamientos, así como para caracterizar el repertorio inicial de los dadores sanos y las muestras de pacientes. Se pudo avanzar significativamente en el desarrollo de un protocolo que permita caracterizar las variantes de Vβ en linfocitos T. Sin embargo, no se ha podido validar la metodología por ausencia de controles necesarios que permitan establecer la especificidad del método. Además, se determinó que será necesaria la generación de paneles de *primers* para el análisis propuesto, personalizando la selección de las variantes Vβ a analizar en función de los objetivos del análisis. Se identificaron homologías entre variantes de Vβ murinas y humanas usando herramientas bioinformáticas, un análisis no reportado antes. Combinando esto con la especificidad de Vβ frente a los SAgs del MMTV, se propuso una posible correspondencia entre las variantes de SAgs estudiadas y muestras humanas, facilitando el diseño de *primers* específicos para su validación empírica. Si bien ya hubo abordajes para este tipo de procedimientos, nunca fueron aplicados para SAgs virales (Langerak et al., 2001; J. Y. Park & Seo, 2016; Seo et al., 2010)**.** Sumado a esto, en diálogo con varias instituciones de diagnóstico, seguimiento e investigación de enfermedades hematooncológicas las mismas han mostrado particular interés en utilizar un posible panel de caracterización a fin de generar más información sobre los cuadros de pacientes de alteraciones de los linfocitos T, para poder luego aplicar dichos conocimientos en beneficio de las personas. A futuro se propone optimizar el panel de *primers,* validarlo para su uso como caracterización del repertorio de clones linfocitarios en muestras humanas y utilizarlo para determinar si la actividad biológica de las VLPs es específica.

Las únicas evidencias de uso de SAgs del MMTV en el tratamiento de leucemias y linfomas provienen del grupo de trabajo que anteceden a esta tesis, el cual evaluó el efecto de los virus completos en ratones (Mundiñano et al., 2010). Para el uso de muestras

humanas, el único tratamiento comparable sería el uso de SAgs bacterianos para las mismas patologías (Duarte et al., 2023; Noli Truant et al., 2022; Tötterman et al., 1998). Se puede observar que los SAgs bacterianos ofrecen una respuesta mucho más rápida para inducir muerte celular en los linfocitos (72 hs) pero son altamente tóxicos para los seres humanos. Al respecto, los resultados presentados en esta tesis se han logrado obtener con células de voluntarios sanos, que poseen un repertorio particular de linfocitos y no hay una sobrerrepresentación de algunos clones linfocitarios. En esa línea, se podrían evaluar los efectos comparados de las $VLPs_{Z\text{-}SAgs}$ y los SAgs bacterianos, utilizando líneas celulares de células T neoplásicas (como las Jurkat) y de ser posible, muestras de pacientes con leucemias o linfomas T.

Actualmente, los desarrollos para el abordaje de leucemias y linfomas se encuadran dentro de la terapéutica, siendo $VLPs_{Z\text{-}SAgs}$ parte de esta categoría, por tratarse de un sistema de vehiculización de un componente que actúa sobre las células de forma específica. Por un lado, existen desarrollos de formulaciones portando neoantígenos, como por ejemplo el caso de péptidos específicos que expresan las células leucémicas, combinados con anticuerpos contra PD-1 (Xie et al., 2021). Otro de los desarrollos al respecto es un candidato vacunal que consta de un compuesto activo contra las células leucémicas, conjugado a un adyuvante para mejorar la respuesta inmune. Dicho desarrollo ha mostrado muy buenos resultados, logrando un 100% de protección ante recaídas y entre un 50 y 70% de resolución de la enfermedad (Zhang et al., 2025). Por otro lado, un tratamiento muy similar al propuesto en esta tesis es el uso de células CAR-T, en las cuales se modificó el receptor de linfocitos T CD8+ para prevenir las recaídas asociadas a un tratamiento primario en leucemias mielocíticas agudas. Si bien se obtuvieron buenos resultados, no se observó un impacto en un aumento de la supervivencia de los pacientes (Mazziotta et al., 2025).

Teniendo en cuenta los resultados preliminares observados en lo que respecta a la actividad biológica de las $VLPs_{Z\text{-}SAgs}$, consideramos que sería importante continuar con los ensayos utilizando más muestras de voluntarios sanos y potencialmente de pacientes para poder probar la hipótesis planteada en la presente tesis. Asimismo, sería interesante continuar explorando los mecanismos mediante los cuales los SAgs inducen los fenómenos observados, caracterizando por ejemplo las vías de apoptosis implicadas o los componentes requeridos para que ocurra el efecto de los mismos.

Una serendipia llevó a la inclusión del **Capítulo VI** en esta tesis, gracias a una estancia de investigación corta en la Universidad de Nuevo México, Estados Unidos. La colaboración permitió explorar la vehiculización del SAg BALB2 en la cara externa de VLPs generadas en sistemas bacterianos. Ya de por si haber podido aprender diversas técnicas que no se encontraban disponibles en nuestro país fue lo suficientemente enriquecedor, pero además se pudieron lograr diversos resultados para presentar en esta tesis. Comenzando con el

sistema de vehiculización utilizando la proteína de la cápside de AP205 se logró diseñar, construir las herramientas de vehiculización y expresar las proteínas de fusión de la cápside con las dos variantes de BALB2 utilizando las cepas BL21, BL21 *Magic* y Rosetta. Lamentablemente luego no fue posible obtener las partículas encapsulando adecuadamente el ARN. Una de las posibilidades es que el impedimento sea estérico, ya que el tamaño de los antígenos a vehiculizar casi duplica el peso molecular de la proteína de cápside de AP205. Como alternativa a dicha problemática se plantea por un lado realizar una co-transformación de los plásmidos pAPKP portando las construcciones deseadas junto con un plásmido que exprese la proteína de cápside WT, lo que se ha utilizado en otras oportunidades para forzar la producción de VLPs del sistema. Por otro lado, se podría utilizar una estrategia de dímeros de la proteína de cápside, utilizando el plásmido pAPKP2 que posee dos copias de la proteína de cápside de AP205, como se ha reportado en otros casos (Liu et al., 2021). Sin embargo, eso implicaría reemplazar una de las copias de la proteína de cápside con la fusión generada en los plásmidos construidos y para ello es necesario generar nuevos *primers* ya que las enzimas utilizadas en el clonado no son compatibles.

Las VLPs derivadas de proteínas de bacteriófagos han conformado un sin número de desarrollos innovadores, pero una ventaja de las VLPs generadas en sistemas celulares eucariotas es que a pesar de su alto costo y ser trabajosas, hasta el momento ninguna VLP basada en bacteriófagos se encuentra aprobada para su uso en seres humanos.

Con respecto a la generación de VLPs quiméricas utilizando el sistema SpyCatcher/SpyTag se logró por un lado la producción, purificación y caracterización de las VLPs SpyCatcher. Los resultados obtenidos para dichas partículas se condicen con trabajos relacionados publicados, en relación al peso molecular de las bandas de expresión, el tamaño de las partículas y los protocolos utilizados. Por otro lado, se logró la producción y purificación en forma soluble de los SpyTag-SAgs utilizando las bacterias *E. coli* cepa Rosetta, lo cual implica un logro superador con respecto a los resultados del **Capítulo IV**. Es necesario continuar optimizando la conjugación para obtener las VLPs quiméricas finales. Por un lado, idealmente deberían probarse mezclar concentraciones incrementadas de cada antígeno para una misma cantidad de VLPs y evaluar cual es la mejor proporción que funciona y hasta que punto el sistema se satura en la conjugación. Además, queda pendiente analizar el efecto de tanto la urea como el DTT en la estructura de las VLPs, ya que las concentraciones presentes en la preparación de los antígenos podrían afectarlas, así como la reacción de conjugación. Por falta de tiempo, el protocolo no pudo ser continuado, esperando poder avanzar con este sistema de conjugación en futuros proyectos. Por otro lado, en caso que no se pueda lograr la conjugación como se ha planteado, el gran beneficio que tiene el sistema *Plug and Display* es que se puede abordar la producción de los antígenos en otro sistema, como el eucariota (Tan et al., 2021). En ese sentido, las VLPs generadas podrían ser más

similares para comparar con las producidas con el sistema Z, pero portando los antígenos en la cara externa.

Los resultados alcanzados en el presente trabajo de investigación son promisorios, sentando las bases para el diseño de diferentes estrategias de vehiculización de antígenos heterólogos en VLPs tanto derivadas de la proteína Z del virus Junín, como utilizando proteínas de cápside de bacteriófagos o nanojaulas sintéticas. En conjunto, los resultados globales del presente trabajo de investigación muestran el diseño integral desde la estrategia de generación de las construcciones requeridas para la expresión de SAgs en sistemas heterólogos hasta la optimización preliminar de un protocolo para evaluar su potencialidad como tratamiento contra leucemias y linfomas.

Si bien en esta tesis se abordó el uso de las $VLPs_{Z\text{-}SAgs}$ para la terapéutica de linfomas y leucemias T, me gustaría tratar de considerar una potencialidad enorme de su uso. Como primera consideración, cabe resaltar nuevamente que los resultados presentados en la presente tesis al respecto de la actividad biológica de los mismos son preliminares. En segunda instancia, el desarrollo propuesto aquí se proyectó para leucemias y linfomas, pero en caso de verificar que no son útiles como tratamiento en forma empírica, podrían ser herramientas terapéuticas de potencial utilidad para otras patologías. En este sentido, la actividad linfotóxica reportada en bibliografía permitiría que puedan utilizarse para otras patologías, como artitis reumatoidea, eliminación de linfocitos exhaustos en procesos oncológicos, entre otras (Joedicke et al., 2014; G. Wang et al., 2014). En este sentido, me gustaría resaltar la importancia de poner en valor todos los conocimientos generados sobre los SAgs virales que se han acumulado en el tiempo y la importancia de convertirlos en herramientas provechosas para la sociedad. Asimismo, resulta evidente la necesidad de estrechar aún más los lazos de colaboración entre los centros de salud y los centros de investigación, para responder ante las necesidades requeridas, permitiendo que ocurra por ejemplo el abordaje del diseño de un panel de *primers* para caracterizar los repertorios linfocitarios. En estos difíciles tiempos para la ciencia y la tecnología, debemos reforzar la colaboración y los intercambios de muestras, el encuentro en los espacios de formación y las instancias de ampliación del conocimiento para permitir que los conocimientos y desarrollos generados en las cuatro paredes de nuestros laboratorios puedan llegar efectivamente a modificar las realidades de nuestro territorio.

CAPÍTULO VIII: ANEXO DE PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Cultivo celular

- Medio DMEM completo: DMEM con alto contenido de glucosa (Gibco), en presencia de antibiótico y antimicótico (*stock* 100X: 10.000 unidades/mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomicina y 25 µg/mL de antimicótico *Fungizone,* Gibco*)* y 10% de Suero Fetal Bovino de calidad Biotecnológica (SFB, Internegocios).
- Medio DMEM 2%: Medio DMEM suplementado con antibiótico y antimicótico (*Fungizone*, Gibco) y 2% de SFB (Internegocios).
- PBS (*Phosphate-buffered Saline):* NaCl 1,37 M; KCl 0,027 M; Na_2HPO_4 0,1 M; KH_2PO_4 0,018 M*;* pH 7.8. Esta solución se preparó como *stock* 10X y luego la dilución con agua estéril se realizó inmediatamente antes de su uso.
- Medio de congelado: 90% SFB y 10% DMSO estéril. El mismo se preparó al menos 2 horas antes de ser utilizado y se conservó a -20°C.
- Medio RPMI completo: medio RPMI-1640 (Gibco), suplementado con 10% SFB (Natocor), L-glutamina 2mM (Gibco) y penicilina-estreptomicina (Gibco).

Purificación de VLPs

- Sacarosa 30% m/v: Se pesó la cantidad correspondiente de sacarosa de un frasco que únicamente se abrió en condiciones de asepsia (Ciccarelli) y se adicionaron los volúmenes correspondientes de agua estéril de sachet.
- Solución de Bradford: Se disuelven 10 mg de azul de Coomassie G-250 en 5 mL de etanol, luego se añaden 10 mL de ácido fosfórico y finalmente agua hasta completar 100 mL.

Biología molecular

Cultivos bacterianos

- LB líquido: 5 g de extracto de levadura; 10 g de Triptona (peptona de carne); 10 g de NaCl; H_2O hasta llevar a 1 litro. Luego de ser autoclavado en botellas de 250 mL, se almacenó a temperatura ambiente en el gabinete estéril para ser utilizado.
- LB sólido: 5 g de extracto de levadura; 10 g de Triptona (peptona de carne); 10 g de NaCl; agar microbiológico en un porcentaje del 1,5% final y agua destilada hasta llevar a 1 litro. También fue autoclavado inmediatamente luego de su preparación y se almacenó a temperatura ambiente en el gabinete estéril para ser utilizado.

Clonado molecular

- Soluciones de miniprep:
    - Solución I: Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM [pH 8,0], EDTA 10 mM;

- Solución II: NaOH 0,2 N, SDS 1 % (preparada en el momento);
- Solución III: Acetato de Potasio 5M [pH 4,8]).
- *buffer* QG: GuSCN 5.5 M (PM 118,16); Tris HCl 20 mM pH 6.6
- *buffer* PE: Tris- HCl 10 mM pH 7.5; 80% etanol
- *buffer* EB: 10 mM Tris-Cl, pH 8.5

Electroforesis de geles

- TAE 1X: Tris base 0,04 M, Ácido Acético Glacial 1,14 mL/L; EDTA pH 8, 1 mM. Esta solución se prepara como 50X y se diluye a la concentración de uso inmediatamente antes de ser utilizada.
- *Buffer* naranja G 5X: Tris-HCl 50 mM pH 8; EDTA 10 mM, 0,025% Orange G; 50% glicerol.
- *buffer* Tris-Glicina: Tris base 25 mM; Glicina pH 8,3 250 mM; SDS 0,1%.
- *buffer* de siembra 4X: Tris-HCl pH 6,8 200mM; *Bromophenol Blue* 0,4%; Glicerol 40%; SDS 8%; DTT 400mM.
- Solución de tinción de geles de poliacrilamida: *Coomasie brilliant blue* R-250 0,25% m/V; Etanol 45% v/v; Ácido acético glacial 10% v/v.
- Solución de destinción de geles de poliacrilamida: Etanol absoluto 40% v/v; Ácido acético glacial 10% v/v.

Preparación de bacterias competentes térmicas

- INOUE 10 mM: $MnCl_2$:$4H_2O$ 55 mM, $CaCl_2$:$2H_2O$ 15 mM, KCl 250 mM, PIPES (0.5 M, pH 6.7 y agua miliQ para llegar a volumen final.

Western Blotting

- *Buffer* de transferencia: Tris Base 0,3% m/v, glicina 1,44% m/v, SDS 10% v/v.
- Caseína 3% m/v: Se pesó la cantidad correspondiente a la caseína y se diluyó con agua. Luego, se llevó a pH 8 para que la caseína se encuentre disuelta en la solución. Alícuotas de esta preparación fueron almacenadas a -20°C.
- Solución de bloqueo: Caseína 3% m/v diluida en PBS llevada a concentración final de 1% y a un pH de 8.
- Solución de dilución: PBS-caseína 1% m/v, TWEEN®-20 0,1% y PBS 1X hasta llegar a volumen final.
- Solución de Rojo Ponceau: Ponceau S 0,1 %, Ácido acético glacial 5%.
- Solución de Amido Black: Amido Black 0.1% m/v, isopropanol 25% v/v y ácido acético glacial 10% v/v.

ELISA

- *buffer* de *coating:* 10 mL de carbonato de sodio 1M, 90 mL de bicarbonato de sodio 1M y 900 mL de solución de cloruro de sodio 0,14 M.
- Solución de lavado: TWEEN-20 0,2%, NaCl 18,6 g/L diluidos en PBS 1X. Se conservó a 4°C hasta su uso.
- *Buffer* de dilución/bloqueo: TWEEN-20 0,2%, NaCl 18,6 g/L y caseína 1% m/v diluidos en PBS 1X.

Producción de proteínas recombinantes y solubilización de cuerpos de inclusión

- *buffer* de lisis: Tris-HCl 20 mM pH 8.0, EDTA 5mM, Imidazol 5 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, PMSF 10 mM y DTT 1mM.
- *buffer* de lisis con trehalosa: Tris-HCl 20 mM pH 8.0, EDTA 5mM, Imidazol 5 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, PMSF 10 mM, trehalosa 0,75 M y DTT 1mM.
- *Buffer* 2X: TrisHCl 50 mM pH 8, NaCl 1M, Glicerol 10% v/v, Imidazol-HCl 41,66 mM, urea 8M.
- *Buffer* de lavado Tris: TrisHCl 0,02 M pH 8.
- *Buffer* lavado urea: Tris-HCl 20mM, NaCl 0,5M, urea 2M, Triton X-100 2%, pH 8,0
- *Buffer* de lavado tritón: *Buffer* lavado urea 5 mL, Triton X-100 0,1 mL
- *Buffer* A: Para 45 mL: *Buffer* 2X 22,5 mL, TrisHCl 1M pH 8 0,2 mL, NaCl 3M 1,25 mL, DTT 1M 22,5 µL y PMSF 10 mM.
- *Buffer B: Para 15 mL*: Imidazol-HCl 1,25 M 3mL, *Buffer* 2X 7,5 mL, 3,6 gramos de urea y 7,5 µL de DTT 1M.

Diálisis

- **Solución de diálisis:** *Buffer* Tris HCl 25 mM pH 8, NaCl 500 mM y DTT 0,2 mM.
- **Solución de diálisis II:** *Buffer* Tris HCl 25 mM pH 8, NaCl 500 mM, DTT 0,2 mM, glicerol 10% v/v y urea 6M.

Purificación de VLPs en bacterias

- ***Buffer* de lisis sin DTT:** Para 500 mL: 10mL NaCl 5M, 10 mL de EDTA 0.5M y 25 mL de Tris-HCl 1M pH 8.5.
- ***SCB* 1X:** Para 1 litro: 10mL de Tris HCl 1M pH 8.5, 20mL de NaCl 5M y 1mL de $MgSO_4$ 1M.

CAPÍTULO IX: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acha-Orbea, H., & MacDonald, H. R. (1995). Superantigens of Mouse Mammary Tumor Virus. *Annual Review of Immunology*, *13*(Volume 13, 1995), 459-486. https://doi.org/10.1146/annurev.iy.13.040195.002331

Ahanotu, E., Alvelo-Ceron, D., Ravita, T., & Gaunt, E. (2006). Staphylococcal Enterotoxin B as a Biological Weapon: Recognition, Management, and Surveillance of Staphylococcal Enterotoxin. *Appl. Biosafety*, *11*, 120-126. https://doi.org/10.1177/153567600601100303

Ahmed, S., Parthasarathy, D., Newhall, R., Picard, T., Aback, M., Ratnapriya, S., Arndt, W., Vega-Rodriguez, W., Kirk, N. M., Liang, Y., & Herschhorn, A. (2023). Enhancing anti-viral neutralization response to immunization with HIV-1 envelope glycoprotein immunogens. *Npj Vaccines*, *8*(1), 181. https://doi.org/10.1038/s41541-023-00774-z

Ardavín, C., Martín, P., Ferrero, I., Azcoitia, I., Anjuère, F., Diggelmann, H., Luthi, F., Luther, S., & Acha-Orbea, H. (1999). B cell response after MMTV infection: Extrafollicular plasmablasts represent the main infected population and can transmit viral infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *162*(5), 2538-2545.

Ball, J. P., Springer, M. J., Ni, Y., Finger-Baker, I., Martinez, J., Hahn, J., Suber, J. F., DiMarco, A. V., Talton, J. D., & Cobb, R. R. (2017). Intranasal delivery of a bivalent norovirus vaccine formulated in an in situ gelling dry powder. *PloS One*, *12*(5), e0177310. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177310

Baumjohann, D., Preite, S., Reboldi, A., Ronchi, F., Ansel, K. M., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2013). Persistent Antigen and Germinal Center B Cells Sustain T Follicular Helper Cell Responses and Phenotype. *Immunity*, *38*(3), 596-605. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.11.020

Benen, T. D., Tonks, P., Kliche, A., Kapzan, R., Heeney, J. L., & Wagner, R. (2014). Development and immunological assessment of VLP-based immunogens exposing the membrane-proximal region of the HIV-1 gp41 protein. *Journal of Biomedical Science*, *21*(1), 79. https://doi.org/10.1186/s12929-014-0079-x

Bessa, J., Schmitz, N., Hinton, H. J., Schwarz, K., Jegerlehner, A., & Bachmann, M. F. (2008). Efficient induction of mucosal and systemic immune responses by virus-like particles administered intranasally: Implications for vaccine design. *European Journal of Immunology*, *38*(1), 114-126. https://doi.org/10.1002/eji.200636959

Bevilacqua, G. (2022). The Viral Origin of Human Breast Cancer: From the Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) to the Human Betaretrovirus (HBRV). *Viruses*, *14*(8), Article 8. https://doi.org/10.3390/v14081704

Bieniasz, P. D. (2006). Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology*, *344*(1), 55-63. https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.044

Bispo, J. A. B., Pinheiro, P. S., & Kobetz, E. K. (2020). Epidemiology and Etiology of Leukemia and Lymphoma. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *10*(6), a034819. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034819

Borio, C. S., Bilen, M. F., Argüelles, M. H., Goñi, S. E., Iserte, J. A., Glikmann, G., & Lozano, M. E. (2012). Antigen vehiculization particles based on the Z protein of Junin virus. *BMC Biotechnology*, *12*(1), 80. https://doi.org/10.1186/1472-6750-12-80

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. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Brandt-Carlson, C., Butel, J. S., & Wheeler, D. (1993). Phylogenetic and Structural Analyses of MMTV LTR ORF Sequences of Exogenous and Endogenous Origins. *Virology*, *193*(1), 171-185. https://doi.org/10.1006/viro.1993.1113

Buggiano, Goldman, Nepomnaschy, Bekinschtein, Berguer, Lombardi, Deroche, Francisco, & Piazzon. (1999). Characterization of Two Infectious Mouse Mammary Tumour Viruses: Superantigenicity and Tumorigenicity. *Scandinavian Journal of Immunology*, *49*(3), 269-277. https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.1999.00502.x

Buggiano, V., Schere Levy, C., Gattelli, A., Cecilia Cirio, M., Marfil, M., Nepomnaschy, I., Piazzon, I., Helguero, L., Vanzulli, S., & Kordon, E. C. (2002). Origin and Progression of Pregnancy-Dependent Mammary Tumors Induced by New Mouse Mammary Tumor Virus Variants. *Breast Cancer Research and Treatment*, *75*(3), 191-202. https://doi.org/10.1023/A:1019932516887

Buggiano, V., Schere-Levy, C., Abe, K., Vanzulli, S., Piazzon, I., Smith, G. H., & Kordon, E. C. (2001). Impairment of mammary lobular development induced by expression of TGFβ1 under the control of WAP promoter does not suppress tumorigenesis in MMTV-infected transgenic mice. *International Journal of Cancer*, *92*(4), 568-576. https://doi.org/10.1002/ijc.1232

Burzyn, D., Rassa, J. C., Kim, D., Nepomnaschy, I., Ross, S. R., & Piazzon, I. (2004). Toll-Like Receptor 4-Dependent Activation of Dendritic Cells by a Retrovirus. *Journal of Virology*, *78*(2), 576-584. https://doi.org/10.1128/jvi.78.2.576-584.2004

Caldeira, J. C., Perrine, M., Pericle, F., & Cavallo, F. (2020). Virus-Like Particles as an Immunogenic Platform for Cancer Vaccines. *Viruses*, *12*(5), Article 5. https://doi.org/10.3390/v12050488

Cann, A. J. (2012). Chapter 7—Pathogenesis. En A. J. Cann (Ed.), *Principles of Molecular Virology (Fifth Edition)* (pp. 215-253). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384939-7.10007-9

Capul, A. A., & de la Torre, J. C. (2008). A cell-based luciferase assay amenable to high-throughput screening of inhibitors of arenavirus budding. *Virology*, *382*(1), 107-114. https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.09.008

Cho, K., Ferrick, D. A., & Morris, D. W. (1995). Structure and biological activity of the subgenomic *Mtv*-6 endogenous provirus. *Virology*, *206*(1), 395-402. https://doi.org/10.1016/S0042-6822(95)80055-7

Chronic Lymphocytic Leukemia—Cancer Stat Facts. (s. f.). Recuperado 12 de junio de 2025, de https://seer.cancer.gov/statfacts/html/clyl.html

Cooper, M. D., & Alder, M. N. (2006). The Evolution of Adaptive Immune Systems. *Cell*, *124*(4), 815-822. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.001

Cooper, S. L., & Brown, P. A. (2015). Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatric Clinics of North America*, *62*(1), 61-73. https://doi.org/10.1016/j.pcl.2014.09.006

Cubas, R., Zhang, S., Kwon, S., Sevick-Muraca, E. M., Li, M., Chen, C., & Yao, Q. (2009). Virus-like Particle (VLP) Lymphatic Trafficking and Immune Response Generation After Immunization by Different Routes. *Journal of Immunotherapy*, *32*(2), 118. https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e31818f13c4

Czarneski, J., Berguer, P., Bekinschtein, P., Kim, D. C., Hakimpour, P., Wagner, N., Nepomnaschy, I., Piazzon, I., & Ross, S. R. (2002). Neonatal infection with a milk-borne virus is independent of β7 integrin- and L-selectin-expressing lymphocytes. *European Journal of Immunology*, *32*(4), 945-956. https://doi.org/10.1002/1521-4141(200204)32:4<945::AID-IMMU945>3.0.CO;2-M

Da Silva, D. M., Fausch, S. C., Verbeek, J. S., & Kast, W. M. (2007). Uptake of Human Papillomavirus Virus-Like Particles by Dendritic Cells Is Mediated by Fcγ Receptors and Contributes to Acquisition of T Cell Immunity1. *The Journal of Immunology*, *178*(12), 7587-7597. https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.7587

de la Cruz, V. F., Lal, A. A., & McCutchan, T. F. (1988). Immunogenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage. *The Journal of Biological Chemistry*, *263*(9), 4318-4322.

de Smith, A. J., Wahlster, L., Jeon, S., Yu, F., Black, S., Gazal, S., Mancuso, N., Metayer, C., Ma, X., Wiemels, J. L., Chiang, C. W. K., & Sankaran, V. G. (2022). Racial and Ethnic Disparities in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Risk Due to an IKZF1 Noncoding Regulatory Variant. *Blood*, *140*(Supplement 1), 8880-8881. https://doi.org/10.1182/blood-2022-167965

Deacy, A. M., Gan, S. K.-E., & Derrick, J. P. (2021). Superantigen Recognition and Interactions: Functions, Mechanisms and Applications. *Frontiers in Immunology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.731845

Definición de neoplasia—Diccionario de cáncer del NCI - NCI (nciglobal,ncienterprise). (2011, febrero 2). [nciAppModulePage]. https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/neoplasia

Dika, C., Duval, J. F. L., Ly-Chatain, H. M., Merlin, C., & Gantzer, C. (2011). Impact of Internal RNA on Aggregation and Electrokinetics of Viruses: Comparison between MS2 Phage and Corresponding Virus-Like Particles. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(14), 4939-4948. https://doi.org/10.1128/AEM.00407-11

Driver, D. J., McHeyzer-Williams, L. J., Cool, M., Stetson, D. B., & McHeyzer-Williams, M. G. (2001). Development and Maintenance of a B220− Memory B Cell Compartment1. *The Journal of Immunology*, *167*(3), 1393-1405. https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.3.1393

Duarte, A., Montagna, D. R., Pastorini, M., & Alemán, M. (2023). Apoptosis-mediated inhibition of human T-cell acute lymphoblastic leukemia upon treatment with Staphylococus Aureus enterotoxin-superantigen. *Frontiers in Immunology*, *14*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1176432

Dudley, J. P., Golovkina, T. V., & Ross, S. R. (2016). Lessons Learned from Mouse Mammary Tumor Virus in Animal Models. *ILAR Journal*, *57*(1), 12-23. https://doi.org/10.1093/ilar/ilv044

Enria, D. A., Briggiler, A. M., & Sánchez, Z. (2008). Treatment of Argentine hemorrhagic fever. *Antiviral Research*, *78*(1), 132-139. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.10.010

Ferrero, I., Anjuère, F., Azcoitia, I., Renno, T., MacDonald, H. R., & Ardavín, C. (1998). Viral Superantigen-Induced Negative Selection of TCR Transgenic CD4+ CD8+ Thymocytes Depends on Activation, but not Proliferation. *Blood*, *91*(11), 4248-4254. https://doi.org/10.1182/blood.V91.11.4248

Flint, J., Skalka, A. M., Rall, G. F., & Racaniello, V. R. (2015). *Principles of Virology, Volume I: Molecular Biology*. ASM Press. https://doi.org/10.1128/9781555818951

Fraillery, D., Zosso, N., & Nardelli-Haefliger, D. (2009). Rectal and vaginal immunization of mice with human papillomavirus L1 virus-like particles. *Vaccine*, *27*(17), 2326-2334. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.02.029

Francian, A., Flores-Garcia, Y., Powell, J. R., Petrovsky, N., Zavala, F., & Chackerian, B. (2025). Virus-like particle-based vaccines targeting the Anopheles mosquito salivary protein TRIO. *mSphere*, *10*(2), e00798-24. https://doi.org/10.1128/msphere.00798-24

Francis, D. M., & Page, R. (2010). Strategies to Optimize Protein Expression in E. coli. *Current Protocols in Protein Science*, *61*(1), 5241-52429. https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0524s61

Fries, B. C., & Varshney, A. K. (2013). Bacterial Toxins-Staphylococcal Enterotoxin B. *Microbiology Spectrum*, *1*(2). https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AID-0002-2012

Geest, K. S. M. van der, Abdulahad, W. H., Horst, G., Lorencetti, P. G., Bijzet, J., Arends, S., Heiden, M. van der, Buisman, A.-M., Kroesen, B.-J., Brouwer, E., & Boots, A. M. H. (2015). Quantifying Distribution of Flow Cytometric TCR-Vβ Usage with Economic Statistics. *PLOS ONE*, *10*(4), e0125373. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125373

Giudicelli, V. (2004). IMGT/GENE-DB: A comprehensive database for human and mouse immunoglobulin and T cell receptor genes. *Nucleic Acids Research*, *33*(Database issue), D256-D261. https://doi.org/10.1093/nar/gki010

Goldinger, S. M., Dummer, R., Baumgaertner, P., Mihic-Probst, D., Schwarz, K., Hammann-Haenni, A., Willers, J., Geldhof, C., Prior, J. O., Kündig, T. M., Michielin, O., Bachmann, M. F., & Speiser, D. E. (2012). Nano-particle vaccination combined with TLR-7 and -9 ligands triggers memory and effector CD8+ T-cell responses in melanoma patients. *European Journal of Immunology*, *42*(11), 3049-3061. https://doi.org/10.1002/eji.201142361

Golovkina, T. V., Piazzon, I., Nepomnaschy, I., Buggiano, V., de Olano Vela, M., & Ross, S. R. (1997). Generation of a tumorigenic milk-borne mouse mammary tumor virus by recombination between endogenous and exogenous viruses. *Journal of Virology*, *71*(5), 3895-3903. https://doi.org/10.1128/jvi.71.5.3895-3903.1997

Gomes, L. C., Ferrão, A. L. M., Evangelista, F. C. G., de Almeida, T. D., Barbosa, R. C., Carvalho, M. das G., & de Paula Sabino, A. (2018). Advances in chronic lymphocytic leukemia pharmacotherapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *97*, 349-358. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.105

Goñi, S. E., Borio, C. S., Romano, F. B., Rota, R. P., Pilloff, M. G., Iserte, J. A., Tortorici, M. A., Stephan, B. I., Bilen, M. F., Ghiringhelli, P. D., & Lozano, M. E. (2010). Expression and purification of Z protein from Junín virus. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, *2010*, 970491. https://doi.org/10.1155/2010/970491

Gribben, J. G., & O'Brien, S. (2011). Update on Therapy of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, *29*(5), 544-550. https://doi.org/10.1200/JCO.2010.32.3865

Guo, J., Hou, L., Zhou, J., Wang, D., Cui, Y., Feng, X., & Liu, J. (2022). Porcine Circovirus Type 2 Vaccines: Commercial Application and Research Advances. *Viruses*, *14*(9), Article 9. https://doi.org/10.3390/v14092005

Hamdy, A., & Leonardi, A. (2022). Superantigens and SARS-CoV-2. *Pathogens*, *11*(4), Article 4. https://doi.org/10.3390/pathogens11040390

Harryvan, T. J., de Lange, S., Hawinkels, L. J. A. C., & Verdegaal, E. M. E. (2022). The ABCs of Antigen Presentation by Stromal Non-Professional Antigen-Presenting Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(1), Article 1. https://doi.org/10.3390/ijms23010137

Held, W., Waanders, G. A., Shakhov, A. N., Scarpellino, L., Acha-Orbea, H., & MacDonald, H. R. (1993). Superantigen-induced immune stimulation amplifies mouse mammary tumor virus infection and allows virus transmission. *Cell*, *74*(3), 529-540. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)80054-I

Henrici, R. C., Pecen, T. J., Johnston, J. L., & Tan, S. (2017). The pPSU Plasmids for Generating DNA Molecular Weight Markers. *Scientific Reports*, *7*(1), 2438. https://doi.org/10.1038/s41598-017-02693-1

Hodes, R. J., & Abe, R. (1996). Mouse Endogenous Superantigens: Ms and Mls-like Determinants Encoded by Mouse Retroviruses. *Current Protocols in Immunology*, *17*(1), A.1F.1-A.1F.5. https://doi.org/10.1002/0471142735.ima01fs17

Hu, H., & Steinmetz, N. F. (2021). Development of a Virus-Like Particle-Based Anti-HER2 Breast Cancer Vaccine. *Cancers*, *13*(12), Article 12. https://doi.org/10.3390/cancers13122909

Huber, B. T. (1992). *Mls* genes and self-superantigens. *Trends in Genetics*, *8*(11), 399-402. https://doi.org/10.1016/0168-9525(92)90302-K

Huber, B. T., Hsu, P. N., & Sutkowski, N. (1996). Virus-encoded superantigens. *Microbiological Reviews*, *60*(3), 473-482. https://doi.org/10.1128/mr.60.3.473-482.1996

Hunter, Z., Tumban, E., Dziduszko, A., & Chackerian, B. (2011). Aerosol delivery of virus-like particles to the genital tract induces local and systemic antibody responses. *Vaccine*, *29*(28), 4584-4592. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.04.051

Jennings, G. T., & Bachmann, M. F. (2008). The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biological Chemistry*, *389*(5), 521-536. https://doi.org/10.1515/bc.2008.064

Joedicke, J. J., Myers, L., Carmody, A. B., Messer, R. J., Wajant, H., Lang, K. S., Lang, P. A., Mak, T. W., Hasenkrug, K. J., & Dittmer, U. (2014). Activated CD8+ T cells induce expansion of Vβ5+ regulatory T cells via TNFR2 signaling. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *193*(6), 2952-2960. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400649

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., … Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, *596*(7873), 583-589. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2

Kang, M., Long, T., Chang, C., Meng, T., Ma, H., Li, Z., Li, P., & Chen, Y. (2022). A Review of the Ethical Use of Animals in Functional Experimental Research in China Based on the “Four R” Principles of Reduction, Replacement, Refinement, and Responsibility. *Medical Science Monitor*, *28*, 0-0. https://doi.org/10.12659/MSM.938807

Kim, M.-C., Kim, K.-H., Lee, J. W., Lee, Y.-N., Choi, H.-J., Jung, Y.-J., Kim, Y.-J., Compans, R. W., Prausnitz, M. R., & Kang, S.-M. (2019). Co-Delivery of M2e Virus-Like Particles with Influenza Split Vaccine to the Skin Using Microneedles Enhances the Efficacy of Cross Protection. *Pharmaceutics*, *11*(4), Article 4. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11040188

Knipe, D. M., & Howley, P. (2013). *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins.

Kocabiyik, O., Amlashi, P., Vo, A. L., Suh, H., Rodriguez-Aponte, S. A., Dalvie, N. C., Love, J. C., Andrabi, R., & Irvine, D. J. (2024). Vaccine targeting to mucosal lymphoid tissues promotes humoral immunity in the gastrointestinal tract. *Science Advances*, *10*(22), eadn7786. https://doi.org/10.1126/sciadv.adn7786

Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2012). Common artifacts and mistakes made in electrophoresis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *869*, 633-640. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4_58

Kushnir, N., Streatfield, S. J., & Yusibov, V. (2012). Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*, *31*(1), 58-83. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.083

Labrecque, N., McGrath, H., Subramanyam, M., Huber, B. T., & Sékaly, R. P. (1993). Human T cells respond to mouse mammary tumor virus-encoded superantigen: V beta restriction and conserved evolutionary features. *Journal of Experimental Medicine*, *177*(6), 1735-1743. https://doi.org/10.1084/jem.177.6.1735

Langerak, A. W., van Den Beemd, R., Wolvers-Tettero, I. L., Boor, P. P., van Lochem, E. G., Hooijkaas, H., & van Dongen, J. J. (2001). Molecular and flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire for clonality assessment in mature TCRalphabeta T-cell proliferations. *Blood*, *98*(1), 165-173. https://doi.org/10.1182/blood.v98.1.165

Langford, D. J., Bailey, A. L., Chanda, M. L., Clarke, S. E., Drummond, T. E., Echols, S., Glick, S., Ingrao, J., Klassen-Ross, T., LaCroix-Fralish, M. L., Matsumiya, L., Sorge, R. E., Sotocinal, S. G., Tabaka, J. M., Wong, D., van den Maagdenberg, A. M. J. M., Ferrari, M. D., Craig, K. D., & Mogil, J. S. (2010). Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature Methods*, *7*(6), 447-449. https://doi.org/10.1038/nmeth.1455

Lato, M. W., Przysucha, A., Grosman, S., Zawitkowska, J., & Lejman, M. (2021). The New Therapeutic Strategies in Pediatric T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(9), Article 9. https://doi.org/10.3390/ijms22094502

Lawson, J. S., & Glenn, W. K. (2022). Mouse Mammary Tumour Virus (MMTV) in Human Breast Cancer—The Value of Bradford Hill Criteria. *Viruses*, *14*(4), Article 4. https://doi.org/10.3390/v14040721

Leibly, D. J., Nguyen, T. N., Kao, L. T., Hewitt, S. N., Barrett, L. K., & Van Voorhis, W. C. (2012). Stabilizing Additives Added during Cell Lysis Aid in the Solubilization of Recombinant Proteins. *PLoS ONE*, *7*(12), e52482. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052482

Li, D., Chen, T., Hu, Y., Zhou, Y., Liu, Q., Zhou, D., Jin, X., & Huang, Z. (2016). An Ebola Virus-Like Particle-Based Reporter System Enables Evaluation of Antiviral Drugs In Vivo under Non-Biosafety Level 4 Conditions. *Journal of Virology*, *90*(19), 8720-8728. https://doi.org/10.1128/jvi.01239-16

Liu, X., Chang, X., Rothen, D., Derveni, M., Krenger, P., Roongta, S., Wright, E., Vogel, M., Tars, K., Mohsen, M. O., & Bachmann, M. F. (2021). AP205 VLPs Based on Dimerized Capsid Proteins Accommodate RBM Domain of SARS-CoV-2 and Serve as an Attractive Vaccine Candidate. *Vaccines*, *9*(4), 403. https://doi.org/10.3390/vaccines9040403

Lorch, M. S., Collado, M. S., Argüelles, M. H., Rota, R. P., Spinsanti, L. I., Lozano, M. E., & Goñi, S. E. (2019). Production of recombinant NS1 protein and its possible use in encephalitic flavivirus differential diagnosis. *Protein Expression and Purification*, *153*, 18-25. https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.08.008

Lu, J., & Jiang, G. (2022). The journey of CAR-T therapy in hematological malignancies. *Molecular Cancer*, *21*(1), 194. https://doi.org/10.1186/s12943-022-01663-0

MacLachlan, N. J., & Dubovi, E. J. (Eds.). (2011). Chapter 14—Retroviridae. En *Fenner's Veterinary Virology (Fourth Edition)* (pp. 243-274). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375158-4.00014-6

Magliery, T. J. (2015). Protein stability: Computation, sequence statistics, and new experimental methods. *Current opinion in structural biology*, *33*, 161-168. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.09.002

Mamat, U., Woodard, R. W., Wilke, K., Souvignier, C., Mead, D., Steinmetz, E., Terry, K., Kovacich, C., Zegers, A., & Knox, C. (2013). Endotoxin-free protein production—ClearColi™ technology. *Nature Methods*, *10*(9), 916-916. https://doi.org/10.1038/nmeth.f.367

Manolova, V., Flace, A., Bauer, M., Schwarz, K., Saudan, P., & Bachmann, M. F. (2008). Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *European Journal of Immunology*, *38*(5), 1404-1413. https://doi.org/10.1002/eji.200737984

Mareze, V. A., Borio, C. S., Bilen, M. F., Fleith, R., Mirazo, S., Mansur, D. S., Arbiza, J., Lozano, M. E., & Bruña-Romero, O. (2016). Tests in mice of a dengue vaccine candidate made of chimeric Junin virus-like particles and conserved dengue virus envelope sequences. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(1), 125-133. https://doi.org/10.1007/s00253-015-6973-7

Mazziotta, F., Martin, L. E., Egan, D. N., Bar, M., Kinsella, S., Paulson, K. G., Voillet, V., Lahman, M. C., Hunter, D., Schmitt, T. M., Duerkopp, N., Yeung, C. C. S., Tang, T.-H., Gottardo, R., Asano, Y., Wilcox, E. C., Lee, B., Zhang, T., Lopedote, P., … Chapuis, A. G. (2025). A phase I/II trial of WT1-specific TCR gene therapy for patients with acute myeloid leukemia and active disease post-allogeneic hematopoietic cell transplantation: Skewing towards NK-like phenotype impairs T cell function and persistence. *Nature Communications*, *16*, 5214. https://doi.org/10.1038/s41467-025-60394-0

McLean-Tooke, A., Barge, D., Spickett, G. P., & Gennery, A. R. (2008). T cell receptor Vβ repertoire of T lymphocytes and T regulatory cells by flow cytometric analysis in healthy children. *Clinical and Experimental Immunology*, *151*(1), 190-198. https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03536.x

Metzner, C., Salmons, B., Gunzburg, W. H., Gemeiner, M., Miller, I., Gesslbauer, B., Kungl, A., & Dangerfield, J. A. (2006). MMTV accessory factor Naf affects cellular gene expression. *Virology*, *346*(1), 139-150. https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.10.029

Meyer, B. K., Kendall, M. A. F., Williams, D. M., Bett, A. J., Dubey, S., Gentzel, R. C., Casimiro, D., Forster, A., Corbett, H., Crichton, M., Baker, S. B., Evans, R. K., & Bhambhani, A. (2019). Immune response and reactogenicity of an unadjuvanted intradermally delivered human papillomavirus vaccine using a first generation Nanopatch™ in rhesus macaques: An exploratory, pre-clinical feasibility assessment. *Vaccine: X*, *2*, 100030. https://doi.org/10.1016/j.jvacx.2019.100030

Mohammadian-Hafshejani, A., Farber, I. M., & Kheiri, S. (2024). Global incidence and mortality of childhood leukemia and its relationship with the Human Development Index. *PLOS ONE*, *19*(7), e0304354. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0304354

Mohsen, M. O., & Bachmann, M. F. (2022). Virus-like particle vaccinology, from bench to bedside. *Cellular & Molecular Immunology*, *19*(9), 993-1011. https://doi.org/10.1038/s41423-022-00897-8

Molinari, P., Peralta, A., Maletto, B. A., Pistoresi-Palencia, M. C., Crespo, M. I., Morón, G., & Taboga, O. (2014). Double-layered rotavirus-like particles are efficient carriers to elicit strong CTL responses to delivered heterologous antigens. *Process Biochemistry*, *49*(11), 1929-1935. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.07.014

Momose, H., Mizukami, T., Ochiai, M., Hamaguchi, I., & Yamaguchi, K. (2010). A New Method for the Evaluation of Vaccine Safety Based on Comprehensive Gene Expression Analysis. *BioMed Research International*, *2010*(1), 361841. https://doi.org/10.1155/2010/361841

Moore, D. H., Charney, J., Kramarsky, B., Lasfargues, E. Y., Sarkar, N. H., Brennan, M. J., Burrows, J. H., Sirsat, S. M., Paymaster, J. C., & Vaidya, A. B. (1971). Search for a human breast cancer virus. *Nature*, *229*(5287), 611-614. https://doi.org/10.1038/229611a0

Moradi Vahdat, M., Hemmati, F., Ghorbani, A., Rutkowska, D., Afsharifar, A., Eskandari, M. H., Rezaei, N., & Niazi, A. (2021). Hepatitis B core-based virus-like particles: A platform for vaccine development in plants. *Biotechnology Reports*, *29*, e00605. https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00605

Mottershead, D. G., Hsu, P. N., Urban, R. G., Strominger, J. L., & Huber, B. T. (1995). Direct binding of the Mtv7 superantigen (Mls-1) to soluble MHC class II molecules. *Immunity*, *2*(2), 149-154. https://doi.org/10.1016/s1074-7613(95)80027-1

Mundiñano, J., Berguer, P. M., Cabrera, G., Lorenzo, D., Nepomnaschy, I., & Piazzon, I. (2010). Superantigens increase the survival of mice bearing T cell lymphomas by inducing apoptosis of neoplastic cells. *PloS One*, *5*(12), e15694. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015694

Murphy, K., & Weaver, C. (2016). *Janeway's Immunobiology: Ninth International Student Edition*. W.W. Norton & Company.

Nepal, Y., Francian, A., Flores-Garcia, Y., Roberts, B. T., David, S. A., Zavala, F., & Chackerian, B. (2025). *Virus-like particle vaccines targeting a key epitope in circumsporozoite protein provide sterilizing immunity against malaria* (p. 2025.03.03.641239). bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2025.03.03.641239

Nepomnaschy, I., Buggiano, V., Goldman, A., Deroche, A., Bekinschtein, P., Berguer, P., & Piazzón, I. (1997). Aumento de la tumorigenicidad mamaria por recombinación entre MMTV exógenos y endógenos. *Medicina (Buenos Aires)*, *57*, 327-331.

Nepomnaschy, I., Buggiano, V., Goldman, A., & Piazzón, I. (1997). Mecanismos coevolutivos entre los retrovirus y sus huéspedes. El modelo del Tumor Mamario Murino. *Medicina (Buenos Aires)*, *57*(2), 235-244.

Noli Truant, S., Redolfi, D. M., Sarratea, M. B., Malchiodi, E. L., & Fernández, M. M. (2022). Superantigens, a Paradox of the Immune Response. *Toxins*, *14*(11), Article 11. https://doi.org/10.3390/toxins14110800

O'Connell, K. E., Mikkola, A. M., Stepanek, A. M., Vernet, A., Hall, C. D., Sun, C. C., Yildirim, E., Staropoli, J. F., Lee, J. T., & Brown, D. E. (2015). Practical murine hematopathology: A comparative review and implications for research. *Comparative Medicine*, *65*(2), 96-113.

Palladini, A., Thrane ,Susan, Janitzek ,Christoph M., Pihl ,Jessica, Clemmensen ,Stine B., de Jongh ,Willem Adriaan, Clausen ,Thomas M., Nicoletti ,Giordano, Landuzzi ,Lorena, Penichet ,Manuel L., Balboni ,Tania, Ianzano ,Marianna L., Giusti ,Veronica, Theander ,Thor G., Nielsen ,Morten A., Salanti ,Ali, Lollini ,Pier-Luigi, Nanni ,Patrizia, & and Sander, A. F. (2018). Virus-like particle display of HER2 induces potent anti-cancer responses. *OncoImmunology*, *7*(3), e1408749. https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1408749

Parisi, F., Freer, G., Mazzanti, C. M., Pistello, M., & Poli, A. (2022). Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) and MMTV-like Viruses: An In-depth Look at a Controversial Issue. *Viruses*, *14*(5), Article 5. https://doi.org/10.3390/v14050977

Park, C. G., Jung, M. Y., Choi, Y., & Winslow, G. M. (1995). Proteolytic processing is required for viral superantigen activity. *The Journal of Experimental Medicine*, *181*(5), 1899-1904. https://doi.org/10.1084/jem.181.5.1899

Park, J. Y., & Seo, K. S. (2016). Quantification of a Selective Expansion of T Cell Receptor Vβ by Superantigen Using Real-Time PCR. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1396*, 167-180. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3344-0_15

Peña, C., Valladares, X., Soto, C., Encina, A., Marinov, N., Undurraga, M. S., & Cabrera, M. E. (2016). Cerebriform variant type of T cell prolymphocytic leukemia: Report of one case. *Revista médica de Chile*, *144*(1), 124-128. https://doi.org/10.4067/S0034-98872016000100016

Perzova, R., Abbott, L., Benz, P., Landas, S., Khan, S., Glaser, J., Cunningham, C. K., & Poiesz, B. (2017). Is MMTV associated with human breast cancer? Maybe, but probably not. *Virology Journal*, *14*(1), 196. https://doi.org/10.1186/s12985-017-0862-x

Pitoiset, F., Vazquez, T., Levacher, B., Nehar-Belaid, D., Dérian, N., Vigneron, J., Klatzmann, D., & Bellier, B. (2017). Retrovirus-Based Virus-Like Particle Immunogenicity and Its Modulation by Toll-Like Receptor Activation. *Journal of Virology*, *91*(21), e01230-17. https://doi.org/10.1128/JVI.01230-17

Pollard, A. J., & Bijker, E. M. (2021). A guide to vaccinology: From basic principles to new developments. *Nature Reviews Immunology*, *21*(2), 83-100. https://doi.org/10.1038/s41577-020-00479-7

Proft, T., & Fraser, J. D. (2003). Bacterial superantigens. *Clinical and Experimental Immunology*, *133*(3), 299-306. https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2003.02203.x

Pushko, P., Kort, T., Nathan, M., Pearce, M. B., Smith, G., & Tumpey, T. M. (2010). Recombinant H1N1 virus-like particle vaccine elicits protective immunity in ferrets against the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *Vaccine*, *28*(30), 4771-4776. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.04.093

Qin, W., Golovkina, T. V., Peng, T., Nepomnaschy, I., Buggiano, V., Piazzon, I., & Ross, S. R. (1999). Mammary Gland Expression of Mouse Mammary Tumor Virus Is Regulated by a Novel Element in the Long Terminal Repeat. *Journal of Virology*, *73*(1), 368-376. https://doi.org/10.1128/jvi.73.1.368-376.1999

Raetz, E. A., & Teachey, D. T. (2016). T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Hematology*, *2016*(1), 580-588. https://doi.org/10.1182/asheducation-2016.1.580

Rahikainen, R., Rijal, P., Tan, T. K., Wu, H.-J., Andersson, A.-M. C., Barrett, J. R., Bowden, T. A., Draper, S. J., Townsend, A. R., & Howarth, M. (2021). Overcoming Symmetry Mismatch in Vaccine Nanoassembly through Spontaneous Amidation. *Angewandte Chemie International Edition*, *60*(1), 321-330. https://doi.org/10.1002/anie.202009663

Rock, K. L., & Shen, L. (2005). Cross-presentation: Underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunological Reviews*, *207*(1), 166-183. https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00301.x

Romano, I. G., Johnson-Weaver, B., Core, S. B., Jamus, A. N., Brackeen, M., Blough, B., Dey, S., Huang, Y., Staats, H., Wetsel, W. C., Chackerian, B., & Frietze, K. M. (2025). Two doses of Qβ virus like particle vaccines elicit protective antibodies against heroin and fentanyl. *Npj Vaccines*, *10*(1), 57. https://doi.org/10.1038/s41541-025-01105-0

Romanowski, V., Pidre, M. L., Lozano, M. E., & Goñi, S. E. (2017). Arenaviruses and Hemorrhagic Fevers: From Virus Discovery to Molecular Biology, Therapeutics, and Prevention in Latin America. En

J. E. Ludert, F. H. Pujol, & J. Arbiza (Eds.), *Human Virology in Latin America: From Biology to Control* (pp. 195-213). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54567-7_10

Ross, S. R. (2010). Mouse Mammary Tumor Virus Molecular Biology and Oncogenesis. *Viruses*, *2*(9), Article 9. https://doi.org/10.3390/v2092000

Ross, S. R., Dzuris, J. L., Golovkina, T. V., Clemmons, W. C., & van den Hoogen, B. (1997). Mouse mammary tumor virus (MMTV), a retrovirus that exploits the immune system. Genetics of susceptibility to MMTV infection. *Medicina*, *57 Suppl 2*, 34-42.

Rossjohn, J., Gras, S., Miles, J. J., Turner, S. J., Godfrey, D. I., & McCluskey, J. (2015). T cell antigen receptor recognition of antigen-presenting molecules. *Annual Review of Immunology*, *33*, 169-200. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112334

Roy, P., & Noad, R. (2009). Virus-like particles as a vaccine delivery system: Myths and facts. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *655*, 145-158. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1132-2_11

RTS,S Clinical Trials Partnership, Agnandji, S. T., Lell, B., Soulanoudjingar, S. S., Fernandes, J. F., Abossolo, B. P., Conzelmann, C., Methogo, B. G. N. O., Doucka, Y., Flamen, A., Mordmüller, B., Issifou, S., Kremsner, P. G., Sacarlal, J., Aide, P., Lanaspa, M., Aponte, J. J., Nhamuave, A., Quelhas, D., … Vansadia, P. (2011). First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *The New England Journal of Medicine*, *365*(20), 1863-1875. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1102287

Ruzzi, F., Palladini, A., Clemmensen, S., Strøbæk, A., Buijs, N., Domeyer, T., Dorosz, J., Soroka, V., Grzadziela, D., Rasmussen, C. J., Nielsen, I. B., Soegaard, M., Semprini, M. S., Scalambra, L., Angelicola, S., Landuzzi, L., Lollini, P.-L., & Thorn, M. (2022). Prevention and Therapy of Metastatic HER-2+ Mammary Carcinoma with a Human Candidate HER-2 Virus-like Particle Vaccine. *Biomedicines*, *10*(10), Article 10. https://doi.org/10.3390/biomedicines10102654

Ruzzi, F., Semprini, M. S., Scalambra, L., Palladini, A., Angelicola, S., Cappello, C., Pittino, O. M., Nanni, P., & Lollini, P.-L. (2023). Virus-like Particle (VLP) Vaccines for Cancer Immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(16), Article 16. https://doi.org/10.3390/ijms241612963

Salazar-González, J. A., Ruiz-Cruz, A. A., Bustos-Jaimes, I., & Moreno-Fierros, L. (2019). Expression of Breast Cancer-Related Epitopes Targeting the IGF-1 Receptor in Chimeric Human Parvovirus B19 Virus-Like Particles. *Molecular Biotechnology*, *61*(10), 742-753. https://doi.org/10.1007/s12033-019-00198-y

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.

Santolaya, M. E. (1998). Superantígenos y su rol en enfermedades infecciosas. *Revista médica de Chile*, *126*(7), 846-854. https://doi.org/10.4067/S0034-98871998000700014

Sarute, N., & Ross, S. R. (2017). New World Arenavirus Biology. *Annual Review of Virology*, *4*(1), 141-158. https://doi.org/10.1146/annurev-virology-101416-042001

Schlievert, P. M. (1993). Role of Superantigens in Human Disease. *The Journal of Infectious Diseases*, *167*(5), 997-1002. https://doi.org/10.1093/infdis/167.5.997

Seo, K. S., Park, J. Y., Terman, D. S., & Bohach, G. A. (2010). A quantitative real time PCR method to analyze T cell receptor Vbeta subgroup expansion by staphylococcal superantigens. *Journal of Translational Medicine*, *8*, 2. https://doi.org/10.1186/1479-5876-8-2

Serradell, M. C., Rupil, L. L., Martino, R. A., Prucca, C. G., Carranza, P. G., Saura, A., Fernández, E. A., Gargantini, P. R., Tenaglia, A. H., Petiti, J. P., Tonelli, R. R., Reinoso-Vizcaino, N., Echenique, J., Berod, L., Piaggio, E., Bellier, B., Sparwasser, T., Klatzmann, D., & Luján, H. D. (2019). Efficient oral vaccination by bioengineering virus-like particles with protozoan surface proteins. *Nature Communications*, *10*(1), 361. https://doi.org/10.1038/s41467-018-08265-9

Shadman, M. (2023). Diagnosis and Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia: A Review. *JAMA*, *329*(11), 918-932. https://doi.org/10.1001/jama.2023.1946

Shapiro, G. K. (2022). HPV Vaccination: An Underused Strategy for the Prevention of Cancer. *Current Oncology*, *29*(5), Article 5. https://doi.org/10.3390/curroncol29050303

Sharma, R., Ghasparian, A., Robinson, J. A., & McCullough, K. C. (2012). Synthetic virus-like particles target dendritic cell lipid rafts for rapid endocytosis primarily but not exclusively by macropinocytosis. *PloS One*, *7*(8), e43248. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043248

Shattock, A. J., Johnson, H. C., Sim, S. Y., Carter, A., Lambach, P., Hutubessy, R. C. W., Thompson, K. M., Badizadegan, K., Lambert, B., Ferrari, M. J., Jit, M., Fu, H., Silal, S. P., Hounsell, R. A., White, R. G., Mosser, J. F., Gaythorpe, K. A. M., Trotter, C. L., Lindstrand, A., … Bar-Zeev, N. (2024). Contribution of vaccination to improved survival and health: Modelling 50 years of the Expanded Programme on Immunization. *Lancet (London, England)*, *403*(10441), 2307-2316. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)00850-X

Stauder, R., Eichhorst, B., Hamaker, M. E., Kaplanov, K., Morrison, V. A., Österborg, A., Poddubnaya, I., Woyach, J. A., Shanafelt, T., Smolej, L., Ysebaert, L., & Goede, V. (2017). Management of chronic lymphocytic leukemia (CLL) in the elderly: A position paper from an international Society of Geriatric Oncology (SIOG) Task Force. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, *28*(2), 218-227. https://doi.org/10.1093/annonc/mdw547

Strecker, T., Eichler, R., Meulen, J. ter, Weissenhorn, W., Dieter Klenk, H., Garten, W., & Lenz, O. (2003). Lassa Virus Z Protein Is a Matrix Protein Sufficient for the Release of Virus-Like Particles. *Journal of Virology*, *77*(19), 10700-10705. https://doi.org/10.1128/JVI.77.19.10700-10705.2003

Su, C., & Nei, M. (2001). Evolutionary Dynamics of the T-Cell Receptor VB Gene Family as Inferred from the Human and Mouse Genomic Sequences. *Molecular Biology and Evolution*, *18*(4), 503-513. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003829

Tan, T. K., Rijal, P., Rahikainen, R., Keeble, A. H., Schimanski, L., Hussain, S., Harvey, R., Hayes, J. W. P., Edwards, J. C., McLean, R. K., Martini, V., Pedrera, M., Thakur, N., Conceicao, C., Dietrich, I., Shelton, H., Ludi, A., Wilsden, G., Browning, C., … Townsend, A. R. (2021). A COVID-19 vaccine candidate using SpyCatcher multimerization of the SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain induces potent neutralising antibody responses. *Nature Communications*, *12*(1), 542. https://doi.org/10.1038/s41467-020-20654-7

Tangavelou, K., Jiang, S., Dadras, S., Hulse, J. P., Sanchez, K., Bondu, V., Villaseñor, Z., Mandell, M., Peabody, J., Chackerian, B., & Bhaskar, K. (2025). Pathological tau activates inflammatory nuclear factor-kappa B (NF-κB) and pT181-Qβ vaccine attenuates NF-κB in PS19 tauopathy mice. *bioRxiv: The Preprint Server for Biology*, 2025.03.10.642500. https://doi.org/10.1101/2025.03.10.642500

Tariq, H., Batool, S., Asif, S., Ali, M., & Abbasi, B. H. (2022). Virus-Like Particles: Revolutionary Platforms for Developing Vaccines Against Emerging Infectious Diseases. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 790121. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.790121

Temchura, V., Kalinin, S., Nabi, G., Tippler, B., Niezold, T., & Überla, K. (2014). Divergence of Primary Cognate B- and T-Cell Proliferative Responses to Subcutaneous and Intravenous Immunization with Virus-Like Particles. *Viruses*, *6*(8), Article 8. https://doi.org/10.3390/v6083334

Tötterman, T. H., Gidlöf, C., Ragnarsson, L., Högbom, E., Lindeberg, M., von der Lehr, N., Einarsson, A., Soegaard, M., Kristensson, K., Kalland, T., & Dohlsten, M. (1998). Targeted superantigens for immunotherapy of haematopoietic tumours. *Vox Sanguinis*, *74 Suppl 2*, 483-487. https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1998.tb05461.x

Us, D. (2016). [Viral superantigens]. *Mikrobiyoloji Bulteni*, *50*(3), 491-504. https://doi.org/10.5578/mb.24250

Wang, G., Yan, Y., Chen, X., Lin, C., & Li, Y. (2014). SEA antagonizes the imatinib-meditated inhibitory effects on T cell activation via the TCR signaling pathway. *BioMed Research International*, *2014*, 682010. https://doi.org/10.1155/2014/682010

Wang, H., Gallet, B., Moriscot, C., Pezet, M., Chatellard, C., Kleman, J.-P., Göttlinger, H., Weissenhorn, W., & Boscheron, C. (2023). An Inducible ESCRT-III Inhibition Tool to Control HIV-1 Budding. *Viruses*, *15*(12), Article 12. https://doi.org/10.3390/v15122289

Wang, W., Indik, S., Wasilenko, S. T., Faschinger, A., Carpenter, E. J., Tian, Z., Zhang, Y., Wong, G. K.-S., & Mason, A. L. (2015). Frequent proviral integration of the human betaretrovirus in biliary epithelium of patients with autoimmune and idiopathic liver disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, *41*(4), 393-405. https://doi.org/10.1111/apt.13054

Wang, Y., Jiang, J.-D., Xu, D., Li, Y., Qu, C., Holland, J. F., & Pogo, B. G.-T. (2004). A mouse mammary tumor virus-like long terminal repeat superantigen in human breast cancer. *Cancer Research*, *64*(12), 4105-4111. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3880

Winslow, G. M., Scherer, M. T., Kappler, J. W., & Marrack, P. (1992). Detection and biochemical characterization of the mouse mammary tumor virus 7 superantigen (Mls-1a). *Cell*, *71*(5), 719-730. https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90549-R

Wrona, T. J., Lozano, M., Binhazim, A. A., & Dudley, J. P. (1998). Mutational and functional analysis of the C-terminal region of the C3H mouse mammary tumor virus superantigen. *Journal of Virology*, *72*(6), 4746-4755. https://doi.org/10.1128/JVI.72.6.4746-4755.1998

Xie, X., Hu, Y., Ye, T., Chen, Y., Zhou, L., Li, F., Xi, X., Wang, S., He, Y., Gao, X., Wei, W., Ma, G., & Li, Y. (2021). Therapeutic vaccination against leukaemia via the sustained release of co-encapsulated anti-PD-1 and a leukaemia-associated antigen. *Nature Biomedical Engineering*, *5*(5), 414-428. https://doi.org/10.1038/s41551-020-00624-6

Yin, S., Sun, S., Yang, S., Shang, Y., Cai, X., & Liu, X. (2010). Self-assembly of virus-like particles of porcine circovirus type 2 capsid protein expressed from Escherichia coli. *Virology Journal*, *7*, 166. https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-166

Young, D. L., Moore, M. M., & Halstead, L. A. (2015). The use of the quadrivalent human papillomavirus vaccine (gardasil) as adjuvant therapy in the treatment of recurrent respiratory papilloma. *Journal of Voice: Official Journal of the Voice Foundation*, *29*(2), 223-229. https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2014.08.003

Zhang, P., Cui, G., Wang, T., Zhao, X., Wang, X., Ye, R., Liu, T., Zheng, Y., & Zhong, Z. (2025). In situ therapeutic vaccines for leukemia by chemo-nanoadjuvant therapy. *Journal of Controlled Release:*

Official Journal of the Controlled Release Society, *383*, 113851. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2025.113851

Zhou, D., Srivastava, R., Grummel, V., Cepok, S., Hartung, H.-P., & Hemmer, B. (2006). High throughput analysis of TCR-β rearrangement and gene expression in single T cells. *Laboratory Investigation*, *86*(3), 314-321. https://doi.org/10.1038/labinvest.3700381

Tesis de grado y de posgrado

Borio, Cristina S. Estructura y actividad de la proteína Z del virus Junín, Laboratorio de Ingeniería genética y biología molecular y celular. Tesina de licenciatura. Universidad Nacional de Quilmes. 2008

Borio, Cristina S. Estudio de la función y actividad de la proteína Z del virus Junín , Laboratorio de Ingeniería genética y biología molecular y celular. Tesis de doctorado. Universidad Nacional de Quilmes. 2013

Bergier, Julián A. Desarrollo de un sistema de vehiculización de antígenos de rotavirus, a partir de VLPs derivadas de la proteína Z del virus Junín, Laboratorio de Ingeniería genética y biología molecular y celular. Tesina de licenciatura. Universidad Nacional de Quilmes. 2016

Cherñac, Romano. Clonado y expresión del gen Z de virus Junín, Laboratorio de Ingeniería genética y biología molecular y celular. Universidad Nacional de Quilmes. 2006.

De Ganzó, Agustín F. Desarrollo de una plataforma de presentación y vehiculización de antígenos basada en VLPs derivadas del virus Junín, Laboratorio de Ingeniería genética y biología molecular y celular. Tesis de doctorado. Universidad Nacional de Quilmes. 2017

Pastorini, Mercedes. Caracterización de la respuesta celular de VLPs derivadas de la proteína Z del virus Junín y desarrollo de herramientas alternativas, Laboratorio de Virus Emergentes. Tesina de grado. Universidad Nacional de Quilmes. 2019

Páginas web y manuales

American Cancer Society (s.f.). ¿Qué es la leucemia linfocítica crónica?. https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/leucemia-linfocitica-cronica/acerca/que-es-leucemia-linfocitica-cronica.htmlAccedido el 12 de junio de 2025.

American Cancer Society (s.f.). Non-Hodgkin Lymphoma. https://www.cancer.org/cancer/types/non-hodgkin-lymphoma/detection-diagnosis-staging/factors-prognosis.html.Accedido el 12 de junio de 2025.

American Cancer Society (2024). Cancer Facts & Figures 2024. Atlanta: American Cancer Society; 2024.

Askan Emadi y Jennie York Law (2023). Leucemia linfoblástica aguda (LLA). https://www.msdmanuals.com/es/professional/hematolog%C3%ADa-y-oncolog%C3%ADa/leucemias/leucemia-linfobl%C3%A1stica-aguda-lla?ruleredirectid=750. Accedido el 12 de junio de 2025.

Canadian Cancer Society (s.f.). Late effects of treatments for childhood leukemia. https://cancer.ca/en/cancer-information/cancer-types/leukemia-childhood/treatment/late-effects. Accedido el 12 de junio de 2025.

Comité del Consejo Nacional de Investigación de Estados Unidos (2011). Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio – 8va edición. ISBN-13: 978-0-309-15400-0 ISBN-10: 0-309-15400-6

Instituto Nacional de la Salud (2018). Genomic analysis of 33 cancer types completed. https://www.nih.gov/news-events/nih-research-matters/genomic-analysis-33-cancer-types-completed#:~:text=Using%20molecular%20and%20clinical%20information,and%20more%20personalized%20treatment%20approaches. Accedido el 12 de junio de 2025.

Instituto Nacional del Cáncer (2011). Diccionario de cáncer del NCI. https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/neoplasia. Accedido el 12 de junio de 2025.

Instituto Nacional del Cáncer (2012). Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino: incidencia 2000-2009, tendencia de mortalidad 1997-2010- 1a edición. ISBN 978-987-28811-0-8

Instituto Nacional del Cáncer (2015). Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino: incidencia 2000-2013, tendencia temporal de incidencia 2000-2013 Sobrevida 2000-2009 - 1a edición. ISBN 978-987-3945-18-2

Instituto Nacional del Cáncer (NA). Atlas de Mortalidad por Cáncer 2009-2011.

Instituto Nacional del Cáncer (s.f.). Cancer Stat Facts: Leukemia - Chronic Lymphocytic Leukemia. https://seer.cancer.gov/statfacts/html/clyl.html. Accedido el 12 de junio de 2025.

Leukemia and Lymphoma Society (s.f.). T-Cell Prolymphocytic Leukemia (T-PLL). https://www.lls.org/leukemia/t-cell-prolymphocytic-leukemia-t-pll. Accedido el 12 de junio de 2025.

Mayo Clinic(s.f.). Leukemia. https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/leukemia/symptoms-causes/syc-20374373. Accedido el 12 de junio de 2025.

Mayo Clinic(s.f.). Linfoma. https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/lymphoma/symptoms-causes/syc-20352638. Accedido el 12 de junio de 2025.

Moffitt Cancer Center(s.f.). Stages of leukemia. https://www.moffitt.org/cancers/leukemia/diagnosis/stages/#:~:text=The%20stages%20of%20leukemia%20relate,the%20same%20stage%20of%20leukemia. Accedido el 12 de junio de 2025.

Organización Mundial de la Salud (s.f.). Cancer Today - Cancer factsheets. https://gco.iarc.who.int/today/en/fact-sheets-cancers. Accedido el 12 de junio de 2025.

Organización Mundial de la Salud (s.f.). Cancer. https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1. Accedido el 12 de junio de 2025.

Sociedad Argentina de Hematología (2019). Guía de Diagnóstico y Tratamiento. ISBN: 978-987-46625-2-1

SECCIÓN V: AGRADECIMIENTOS

Esta tesis es más de todas las personas que me rodearon y me rodean que de mi autoría en cierto punto. Haber podido llegar a esta instancia es total y completamente por una red colectiva que me acompaño, ayudó y empujó para terminar este enorme trabajo. Sin dudas, todas las probabilidades eran en contra de que esta tesis sea una realidad, pero si he llegado hasta aquí ha sido por la sumatoria de los abrazos y el empuje de muchas personas.

Antes que todo quiero agradecerle a Juan, por haberme apoyado día a día, acompañarme en todo este proceso difícil que fue una tesis doctoral. Por impulsarme a seguir mis sueños y recordarme que todo vale la pena siempre que te haga feliz. También quiero agradecerle a mi familia, que son la hinchada que siempre me banca en las buenas y en las malas. Sin ustedes, nunca podría haber llegado a donde llegué. A Atenas también le dedico esta tesis, que me acompañó en los días y noches de escritura, con mal humor o crisis recurrentes porque el tiempo nunca es suficiente.

Sobre la gente de la Universidad, no tengo palabras para agradecerles. A San, le debo toda mi carrera, gracias por haber cedido a mis propuestas incoherentes, por iniciarme en la docencia, por confiar en mi para la Unidad COVID-19 y por haberme recibido nuevamente post-pandemia. El LVE es un lugar con gente de una calidad humana única y voy a aprovechar para agradecerles por el día a día. Gracias a Majo, Mili, Male, Ele, Mario, Leo, Agus y Gabi. Agradezco también a Cami y a Orne por haber confiado en mí como co-directora de sus seminarios y que también fueron parte necesaria para que yo pueda concluir con esta tesis. También tengo mucho que agradecerles a personas que han pasado por ese laboratorio: Dani, Ceci, Juan, Mati, Agus, Sole, Mari y otros más, que me han acompañado en todo este proceso y también han causado que se convierta en la profesional que soy hoy en día. Por último y no menos importante quiero agradecerle a Iara, a la que tendría que dedicarle un capítulo entero de esta tesis porque me bancó más en las malas que en las buenas, y que sin dudas fue determinante para que yo llegue a esta instancia.

La comunidad de la UNQ es una familia para mí. Creo que no hubo puerta de laboratorio que no haya tocado para pedirles algo y no me hayan ayudado (GRACIAS). Gracias a Luqui, Lauti, Agus, Carli, Sele, Lau, Nacho, Pame, Juli, Nani, Rama, Ole, Eze que a veces me acompañaron con mates, una palabra de aliento o debatiendo sobre cualquier tema que se nos ocurra. Gracias también a todas las personas de la Unidad COVID que fueron fundamentales en que continue en la investigación pública en un momento complicado. Mención especial para Romi, que me acompaño y ayudó en momentos difíciles. Sin dudas es gracias a ella que continué esta tesis.

A Mer tengo que agradecerle por haber confiado en mí como candidata para llevar adelante esta tesis, incluso en momentos en donde ni yo confiaba de lo que era capaz. También por haberme iniciado en la inmunología y la investigación utilizando muestras clínicas. A varias personas del IMEX también les agradezco todo el apoyo y el cariño. Gracias a Flor, Alan, Juli, Fede, Dani, Barbi y Raúl, con quienes compartimos algunos experimentos, mates y por todas las cosas nuevas que aprendí. También quiero agradecer a todas las personas que trabajaron con el MMTV antes que yo, cuyas muestras y anotaciones hicieron posible esta tesis.

A Insu, Salvi, Irre, Juani, Roro, Lu, Gusti, Tiaguito, Laucha, Mel, Calu, Paulina y Prado también les agradezco montones. A todas mis amigas y amigos también, gracias por acompañarme y bancarme, a veces a la distancia y otras veces entre mate y mate (o birra y birra). A la gente de Ciencia Anti Fake News, que también me acompañaron en todo el proceso y siempre que pudieron me dieron una mano. Mención especial a mis inmunoamigues Anita, Lolo y Pau que fueron una gran compañía y apoyo durante mi doctorado.

A mi familia adquirida: a Pau, Dani, Luti, Silvia y David que también me acompañaron todo este tiempo.

Cuando tuve la oportunidad de estar 3 meses en Estados Unidos me encontré también con personas extraordinarias que hicieron que mi experiencia sea hermosa. Gracias a ustedes también estoy acá (Jaimi, Pecj, Mónica, Yogesh, Julianne, Alex, Alan y Garrett). También agradezco a Bryce que confió en mí para presentarme a la beca y que me acompañó, apoyó y enseñó durante toda mi estancia. Siempre les recordaré con mucho cariño. También a Facu que las cosas de la vida nos permitieron que hagamos una estancia financiada por Fulbright y empujemos juntos para lograr doctorarnos.

Hoy, ya a 6 años del comienzo de mi beca doctoral puedo decir que una de mis pasiones es la investigación pública y que ojalá pueda continuar este camino investigando en mi amado país.

Esta tesis es en realidad de todxs ustedes.

Gracias de verdad,