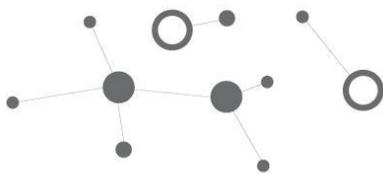


F**B**
FUNDACIÓN H. A.
BARCELÓ
FACULTAD DE MEDICINA



TÍTULO:

**VIRUS-LIKE-PARTICLES (VLP) COMO TRANSPORTADORAS
DE MOLÉCULAS PARA EL TRATAMIENTO DE
LINFOMAS/LEUCEMIAS.**

DIRECTOR: Duarte, Alejandra¹

INVESTIGADORES COLABORADORES: Montagna, Daniela²

FILIACIÓN DE LOS INVESTIGADORES COLABORADORES:

¹ Fundación Universitaria H.A. Barceló. INIGEM-UBA-CONICET.

² IMEX-CONICET-ANM

SEDE-LUGAR: Sede Capital Federal

FECHA: 19/3/2024

CONTACTO DEL DIRECTOR: ales_duarte@hotmail.com;
aduarte@fundacion.barcelo.edu.ar

I. Índice	
II. Resumen	5
III. Palabras clave	5
IV. Abstrac	6
V. Palabras clave en inglés	6
VI. Introducción	7
VI-1 Linfomas y Leucemias	7
VI-2 Superantígenos	8
VI-3 Superantígenos y Linfomas/Leucemias	8
VI-4 Partículas Similares a Virus (Virus Like Particles VLP)	9
VII. Hipótesis y Objetivos	10
VIII. Metodología (materiales y métodos)	10
VIII-1 Cepas de ratones	10
VIII-2 Líneas celulares	10
VIII-3 Obtención de CDs diferenciadas a partir de precursores de médula ósea de ratón	11
VIII-4 Obtención de linfocitos de ganglios de ratón	11
VIII-5 Superantígenos	11
VIII-6 Vectores plasmídicos	12
VIII-7 Técnicas de biología molecular	12
<i>Amplificación mediante PCR</i>	13
<i>Purificación de ácidos nucleicos</i>	13
<i>Electroforesis de ácidos nucleicos</i>	13
VIII-8 Técnicas de clonación bacteriana	13
<i>Obtención de los plásmidos</i>	13
<i>Digestiones enzimáticas</i>	13
<i>Transferencia horizontal y plaqueo</i>	13
<i>Colony PC</i>	14
VIII-9 Electroforesis de proteínas y Western blot	15
VIII-10 Obtención de VLPz-Sag	15
<i>Expresión y recolección de sobrenadantes</i>	15
<i>Purificación de VLPs</i>	16

VIII-11	Técnicas de biología celular.....	16
	<i>Transfección celular</i>	16
	<i>Maduración de células dendríticas in vitro</i>	17
	<i>Inmunocitoquímica</i>	17
	<i>Medición de proliferación: CFSE</i>	18
	<i>Medición de apoptosis: Anexina V</i>	18
	<i>Citometría de flujo</i>	18
VIII-12	Análisis in vivo.....	19
	<i>Modelo tumoral subcutáneo y endovenoso</i>	19
	<i>Cálculo del volumen tumoral</i>	19
	<i>Ensayos de supervivencia</i>	19
	<i>Análisis de sangre</i>	20
VIII-13	Análisis estadístico.....	20
IX.	Resultados	20
IX-1	Clonado molecular.....	20
IX-2	Expresión y purificación de VLPs.....	24
IX-3	Análisis de la capacidad de VLPz-Sag de generar maduración de CDs in vitro.....	25
IX-4	Efecto de VLP-Sag sobre los linfocitos específicos.....	27
IX-5	Efecto antieplásico de Sags in vivo.....	28
	<i>Los Sags suprimen el crecimiento tumoral en ratones NSG</i>	28
	<i>Los Sags aumentan la supervivencia de los ratones con células neoplásicas</i>	31
X.	Conclusión y discusión	34
XI.	Agradecimientos	37
XII.	Bibliografía	38

II. Resumen

Los Superantígenos (Sags) son proteínas de origen bacteriano o viral que se unen sin procesar, a las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), fuera del sitio de unión de antígenos convencionales, y a las células T por el sitio V β del TCR, generando la apoptosis y/o anergia de los linfocitos. Las Virus Like Particles (VLPs) son nanopartículas multiproteicas de conformación viral sin capacidad infectiva, ya que carecen de genoma. Las VLPs se plantean como seguras para uso en formulación de tratamientos o vacunas. Previamente demostramos la capacidad de Sag bacterianos y virales de inducir apoptosis de linfocitos T neoplásicos murinos y humanos *in vitro*. En diferentes especies, incluyendo al hombre, se observó un carácter mono u oligoclonal, en la expresión de la región V β del TCR en linfomas. La hipótesis de trabajo se basa en que las células T neoplásicas humanas que expresan el receptor para el antígeno conservan la capacidad de responder a Sags induciendo apoptosis.

En este trabajo se clonó un Sag viral en un vector que con la proteína Z del Virus Junín. Se Observó un aumento en la expresión de MHC clase I y clase II, y moléculas coestimuladoras CD80 y CD86. Se demostró la capacidad de inducir apoptosis *in vitro* de VLPz-Sag en linfocitos T murinos V β 14 específicos. Además, se avanzó con el análisis sobre estudios *in vivo* sobre ratones SCID/nod con leucemias inducidas por células Jurkat. Se observó una reducción del crecimiento tumoral, disminución de la infiltración de células neoplásicas al torrente sanguíneo, ganglios y bazo. Además, aumentó significativamente la supervivencia de los ratones. Los resultados permiten proponer a esta plataforma para un nuevo tratamiento para células T neoplásicas induciendo la apoptosis de las mismas. Este tratamiento permitiría el aumento en la especificidad en cuanto a las células tratadas y su inducción de apoptosis, reduciendo así el ataque sobre células no neoplásicas.

III. Palabras clave

Superantígenos, Leucemias, Linfomas, VLPs, Tratamiento, Apoptosis.

IV. Abstrac

Superantigen (Sags) are proteins of bacterial or viral origin that are unprocessed, to the molecules of the major histocompatibility complex (MHC), outside the site of union of conventional antigens, and to the T cells by the V β site of the TCR, generating the apoptosis and/or anergy of lymphocytes. Like Particles virus (VLP) are multiproteic nanoparticles of viral conformation without infective capacity, since they lack genome. VLPs are considered safe for use in formulation of treatments or vaccines. Previously we demonstrate the capacity of bacterial and viral sag to induce murine and human neoplastic lymphocyte apoptosis in vitro. In different species, including man, a mono or oligoclonal character was observed, in the expression of the V β region of the TCR in lymphomas. The work hypothesis is based on the fact that human neoplastic T cells that express the antigen receptor retain the ability to respond to Sags inducing apoptosis.

In this work a viral Sag was cloned in a vector that with the Z protein of the Junín virus. An increase in MHC Class I and Class II expression, and CD80 and CD86 coestimulatory molecules and CD86 was observed. The ability to induce in vlpz-sag in vitro apoptosis was demonstrated in specific v β 14 Murino lymphocytes. In addition, progress was made with in vivo studies on SCID/NOD mice with leukemia induced by jurkat cells. A reduction in tumor growth was observed, decreased infiltration of neoplastic cells to blood torrent, ganglia and spleen. In addition, it significantly increased the survival of mice. The results allow to propose to this platform for a new treatment for neoplastic T cells inducing their apoptosis. This treatment would allow the increase in specificity in terms of treated cells and their induction of apoptosis, thus reducing the attack on non-neoplastic cells.

V. Palabras clave en inglés

Superantigen, Leukemia, lymphome, treatment, apoptosis

VI. Introducción

Linfomas y Leucemias:

Las leucemias son un grupo heterogéneo de enfermedades con proliferaciones incontroladas de células madre hematopoyéticas en la médula ósea (1,2). Los cuatro subtipos generales que se encuentran son linfoblástica aguda, mielógena aguda, linfocítica crónica y mielógena crónica (National Cancer Institute). La leucemia linfoblástica aguda ocurre con mayor frecuencia en niños, mientras que los otros subtipos son más comunes en adultos. Los factores de riesgo incluyen tanto a la predisposición genética, como también a los factores ambientales, como la exposición a la radiación ionizante (3). Los linfomas son trastornos malignos que varían con respecto a sus características moleculares, genéticas y presentaciones clínicas. Se distinguen por la proliferación clonal de linfocitos. Debido a que los linfocitos tienen funciones inmunes fisiológicas que varían tanto por linaje como por etapa de diferenciación, la clasificación de los linfomas es compleja. A pesar de los esfuerzos, la clasificación de los linfomas continúa siendo motivo de controversia ya que no se cuenta con un esquema aceptado internacionalmente. El desarrollo del inmunofenotipo por citometría de flujo es una excelente herramienta para el diagnóstico, clasificación y monitoreo de los linfomas, demostrando poseer una alta precisión cuantitativa (4).

Los linfomas/leucemias son la forma más común de neoplasias hematológicas. En conjunto representan un 5,3% de todos los cánceres y corresponden al 56% de todos los cánceres de la sangre (5). Las leucemias constituyen más del 30% de todos los cánceres infantiles. A pesar de que las tasas de curación mejoraron en gran medida, aproximadamente uno de cada cinco niños presenta recaídas con muy baja tasa de supervivencia (6). Aunque el pronóstico de estas enfermedades ha mejorado en los últimos años como consecuencia del uso de tratamientos más intensivos continúa siendo poco satisfactorio (5,6). La terapia citotóxica, como por ejemplo romideosin (bloqueante de la histona desacetilasa) (7), fludarabina, pentostatina (análogos de nucleosidos de purinas) (8), y bortezomib (inhibición selectiva y reversible de la actividad del proteosoma 26S) (9) se asocia usualmente no sólo a una respuesta limitada sino a sustanciales efectos colaterales, siendo la tasa de supervivencia a 5 años sólo del 40-50%.

La inmunoterapia se convirtió en una composición importante en el tratamiento neoplasias hematológicas (10). Los anticuerpos monoclonales utilizados en esquemas terapéuticos como alemtuzumab (dirigido al antígeno CD52) (11), brentuximab (dirigido al antígeno CD30) (12) entre

otros pueden también estar dirigidos hacia antígenos presentes también en tejidos normales. A pesar de esto, ofrecen la posibilidad de una menor toxicidad comparada con la quimioterapia. Por otro lado, las estrategias para inducir una respuesta inmune hacia el tumor se encuentran limitadas puesto que necesitan una adecuada inmunogenicidad de las células neoplásicas y por el hecho de que los pacientes están frecuentemente inmunocomprometidos (13).

Resulta necesario entonces la implementación de terapias eficaces, específicas y con perfiles de toxicidad menores para mejorar el tratamiento poco satisfactorio de linfomas/leucemias humanas.

Superantígenos:

Los Superantígenos (Sags) son proteínas de origen bacteriano o viral que actúan sobre linfocitos T. Estos se unen, como proteínas sin procesar, a las moléculas de MHC clase II, por fuera del sitio de unión de antígenos convencionales.

Los sags T son reconocidos por toda célula T portadora de una región variable beta ($V\beta$) específica (14). Los mejor estudiados son enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* (SEB, SEA, SEE) y *Staphylococcus pyrogenes* (SSA) (14–16). Otros, son codificados por virus, como el Virus del Tumor Mamario Murino (MMTV) que codifican para sags con diferente especificidad al TCR y pueden estimular linfocitos T que expresan diferentes cadenas $V\beta$ s (17,18). La interacción del Sag con el TCR de los linfocitos genera la apoptosis y/o anergia de los mismos.

Hasta el momento, los sags fueron utilizados para aumentar la inmunogenicidad de células tumorales, fusionando los con la región Fab de anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos tumorales(13).

Superantígenos y Linfomas/Leucemias:

Las bases estructurales de la interacción entre linfocitos T normales y sags han sido ampliamente estudiadas(15), pero no así con linfomas/leucemias T humanos.

En nuestro laboratorio demostramos que los sags bacterianos y de MMTV inducen específicamente *in vitro* e *in vivo* la muerte por apoptosis de células de linfomas T murinos que expresan cadenas $V\beta$ reactivas a los mismos(19).

Demostramos además que la principal vía de apoptosis era la extrínseca, estando involucrado el receptor Fas-FasL. Se demostró también la activación de la vía intrínseca, a través del mismo receptor (19).

En ensayos *in vivo* determinamos que el tratamiento de ratones portadores de leucemias T con sags específicos para estas células aumenta la supervivencia induciendo apoptosis específica de las células tumorales. Además, el tratamiento de ratones portadores de neoplasias linfoides T con sags de MMTV determinó la remisión del 90% de la enfermedad (19).

Por otro lado, como evidencia del efecto de los Sags sobre linfomas B, demostramos que la proteína PpL (secretada por *Peptostreptococcus magnus*), sag B que interactúa con la cadena liviana κ del BCR, induce la apoptosis de líneas celulares de linfomas B κ^+ murinos y humanos. Esta inducción se produce por activación de la vía intrínseca de apoptosis, sin verse involucrada la vía extrínseca en este proceso(20).

Partículas Similares a Virus (Virus Like Particles VLP):

El avance en la ingeniería genética ha permitido la generación de VLP, estas moléculas mantienen las mismas propiedades estructurales de los viriones pero sin genoma, por lo que no son infectivas (21). La utilización de VLPs como vectores biológicos cuentan con la ventaja de poder dirigir el transporte de moléculas a la célula blanco, permite la modificación de secuencias génicas y tienen alta capacidad de carga debido a su superficie. Además, la posibilidad de auto ensamblaje y estabilidad termodinámica permite a estas construcciones ser consideradas muy eficientes como plataformas para vacunas y sistemas de transporte de moléculas potencialmente terapéuticas (22).

La proteína Z del virus Junín (JunV), un arenavirus americano, juega un rol importante en la generación de VLPs en ausencia de cualquier otra proteína viral (23). En estas VLPs, la proteína Z (Z-VLPs) se asocia a la superficie interna de la membrana plasmática por su residuo miristoilo (23). Se ha logrado purificar, aislar y expresar la proteína Z del virus Junín. Se evaluó su capacidad para generar VLPs conteniendo eGFP (proteína fluorescente verde) como antígeno modelo (24). Además se demostró que la fusión de la proteína Z a una proteína heteróloga como eGFP, no interfiere con las propiedades fluorescentes de la misma o con su capacidad de brotación en células de mamíferos (24). Estas estructuras pueden ser diseñadas para llevar moléculas específicas en el interior o en la superficie de las mismas. Su capacidad de cierre y las propiedades en la formación de vesículas hacen de estas moléculas posibles transportadoras de antígenos tanto en su interior como en la superficie de las VLP (28, 29).

VII. Hipótesis y Objetivos

Basados en los resultados previos, la Hipótesis del trabajo se basa en que las células T neoplásicas humanas que expresan el receptor para el antígeno conservan la capacidad de responder a Sags y que éstos inducirían la muerte por apoptosis.

El Objetivo General de este proyecto fue avanzar en la elaboración de una herramienta terapéutica novedosa y específica para células T neoplásicas utilizando Z-VLP como moléculas transportadoras de Sags hacia las células presentadoras de antígenos. Esto permitiría la activación y posterior inducción de apoptosis de las células de linfomas/leucemias T.

Objetivos Específicos:

- A. Generar un vector de expresión quimérico de la proteína Z del virus Junín con secuencias de Sags Balb-14.
- B. Estudiar el efecto in vitro de la incubación de VLP-Sags sobre linfocitos T murinos.
- C. Comenzar con el análisis de Sags bacterianos para su utilización como terapia para linfomas/leucemias.

VIII. Metodología (materiales y métodos)

VIII-1 Cepas de ratones

- Ratones SCID/nod que poseen una inmunodeficiencia severa.
- Ratones Balb/c utilizada en diversas áreas de investigación.

Los animales de 4-6 semanas de edad fueron provistos por el bioterio del Instituto de Medicina Experimental-CONICET-Academia Nacional de Medicina (IMEX-CONICET-ANM).

Todas las actividades que impliquen la manipulación de dichos 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 (Protocolo N°009/2016).

VIII-2 Líneas celulares

- Jurkat clon E6-1 (ATCC TIB-202) establecida a partir de una leucemia T aguda como linfocitos T neoplásicos que portan la cadena V β 8 en su TCR y derivada de una leucemia monocítica aguda (ATCC).
- HEK 293T: son células de riñón embrionario humano, que contienen el antígeno T del virus simiano 40 (SV40, Simian Virus 40), lo que genera la replicación de los plásmidos

transfectados que poseen el origen de replicación SV40 y aumenta la expresión de las secuencias clonadas (ATCC).

Las células se mantuvieron en estufa a 37°C y 5% de CO₂. Las líneas se mantuvieron con medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, MP Biomedicals) o Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI, Gibco) con antibiótico 1% (penicilina/estreptomicina) y antimicótico 1% (Fungizone) y SFB 10% (medio completo).

VIII-3 Obtención de CDs diferenciadas a partir de precursores de médula ósea de ratón

Los ratones se sacrificaron con CO₂ y se obtuvieron las tibias y fémures de los mismos. Posteriormente, se extrajeron las células de la médula a través de las epífisis donde se inyectó PBS con SFB (3%) hasta que los huesos quedaron blanquecinos. Luego, se lisaron los glóbulos rojos con cloruro de amonio (0,45M) y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos. Las células se resuspendieron en medio completo. Se contaron y se cultivaron 1x10⁶ células por ml en medio completo con 10ng/ml de GM-CSF (factor de diferenciación de CDs). Se incubaron durante siete días a 37°C y atmósfera de 5 % de CO₂.

VIII-4 Obtención de linfocitos de ganglios de ratón

Los ratones Balb/c fueron eutanasiados en cámara de CO₂ y se obtuvieron sus ganglios mesentéricos e inguinales es esterilidad. Los mismos se disgregaron mecánicamente con un mesh y tijeras estériles agregando de medio RPMI puro. Se centrifugaron las células durante 10 minutos a 1.500 rpm y el pellet se resuspendió en RPMI completo. Se contaron las células y se plaquearon en co-cultivo con CDs en una relación 1:10.

VIII-5 Superantígenos

Sag viral: Se utilizó el Sag Balb-14, el cual tiene afinidad por la cadena Vβ14 del TCR de los linfocitos T murinos (25,26) clonado en el vector comercial pcDNA3.1 (+) (Thermo Fisher Scientific).

Sags bacterianos: Se utilizó el Sag bacteriano SEE, el cual tiene afinidad por las cadenas Vβ5.1, 6.3, 6.4, 6.9 y 8 del TCR de los linfocitos T humanos (27). Esta enterotoxina será utilizada como Sag específico para la línea celular Jurkat y los linfomas derivados de la misma.

VIII-6 Vectores plasmídicos

pcDNA3.1 (+) contiene resistencia a ampicilina para su clonado en bacterias. En este vector se clonó el Sag Balb-14. A este plásmido se lo denominó pcDNA3.1-Sag Balb-14.

pZ-eGFP plásmido derivado del vector pEGFP-N3 (Clontech) que posee clonada la proteína Z del virus Junín. Posee un sitio de clonado múltiple. Contiene kanamicina como marcador de selección. Permite la expresión en células de mamíferos ya que el inserto se encuentra bajo el promotor del CMV y señal de poliadenilación del SV40 (24).

VIII-7 Técnicas de biología molecular

Amplificación mediante PCR

Se clonó el inserto de ADN por PCR (Polymerase Chain Reaction). Como molde se utilizó el plásmido pcDNA3.1-Sag Balb-14 y los reactivos: MgCl₂ 1,5mM, dNTPs 20 μM, primers forward y reverse 1μM c/u (tabla 1) y 1U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen).

Primer		Secuencia	Tm°
Sag Balb-14	Forward (Fw)	5'CGGGATCCGACCCGTCTGCGCACAAAC 3'	65°C
	Reverse (Rv)	5'ATAAGAATGCGGCCGCGGAACCGCAAGGTTGGCC 3'	

Tabla 1: Secuencias de los primers forward y reverse utilizados para amplificar la secuencia del Sag Balb-14.

A los primers Fw y Rv se añadieron secuencias de corte de las enzimas de restricción BamHI y NotI respectivamente para direccionar el ingreso del inserto en el clonado del vector de expresión. El perfil de ciclado puesto a punto y utilizado se muestra en la Tabla 2.

Etapa	Temperatura	Tiempo	N° de Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	2 minutos	1
Desnaturalización	94°C	30 segundos	35
Annealing	60°C	30 segundos	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	5 minutos	1

Tabla 2: Perfil de ciclado obtenido luego de la puesta a punto de las temperaturas y tiempos. Este fue el perfil utilizado para la amplificación del Sag Balb-14.

Purificación de ácidos nucleicos

Se llevó a cabo una precipitación con acetato de sodio. Para esto, se realizó una extracción con cloroformo, se extrajo la fase acuosa y se adicionaron 0,1 vol. de acetato de sodio 3M pH 5,2. Se agregaron 0,6 vol. de isopropanol. Se incubó 15 minutos a -20°C y se centrifugó a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Luego, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con alcohol etílico 70%. Se centrifugó a 14.000 rpm 5 minutos y el precipitado obtenido se incubó a 55°C durante 5 minutos. Se resuspendió en 20 µl de agua ultrapura y se cuantificaron mediante el uso del espectrofotómetro (DeNovix).

Electroforesis de ácidos nucleicos

Con el fin de verificar la integridad y presencia de ácidos nucleicos, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa con buffer TAE 1X (Tris base 0,04 M; Ácido Acético Glacial 1,14 mL/l; EDTA 1 mM, pH 8). A las muestras, antes de sembrarlas, se les agregó buffer Orange G (PB-L) y el gel fue teñido, durante su preparación, con bromuro de etidio (Sigma). El mismo fue utilizado con el fin de determinar el tamaño de los fragmentos lineales y en otros para cuantificar de forma relativa los ácidos nucleicos.

VIII-8 Técnicas de clonación bacteriana

Obtención de los plásmidos: los plásmidos, fueron purificados por miniprep por lisis alcalina, seguida de precipitación con isopropanol. Cultivos bacterianos crecidos ON a 37°C con agitación se centrifugaron a 14.000 rpm. Los pellets se resuspendieron en las tres soluciones correspondientes al protocolo de miniprep. Dichas soluciones son: solución I: Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM (pH 8), EDTA 10 mM; solución II: NaOH 0,2 N, dodecil sulfato sódico (SDS) 1% y solución III: Acetato de Potasio 5 M (pH 4,8). A continuación, se llevó a cabo una extracción orgánica en cloroformo y una posterior precipitación con isopropanol.

Digestiones enzimáticas: se realizaron ON a una temperatura de 37°C, utilizando el buffer y cantidades indicadas por el proveedor (PBL), para realizar una digestión doble. Luego, dichas enzimas fueron inactivadas mediante incubación a 65°C durante 20 minutos.

Transferencia horizontal y plaqueo: Los productos de ligación fueron transformados a una cepa bacteriana XL1-Blue, mediante protocolo de transformación térmica. Se incubó la ligación junto

con 100 µl de bacterias competentes en hielo durante 30 minutos y luego se incubaron a 42°C durante 90 segundos. Luego se incubaron 2 minutos en hielo y agitaron 1 hora a 37°C con medio LB y se plaqueó en placas con agar mas kanamicina 50 µg/ml y tetraciclina 10 ng/µl. Se dejaron las placas en estufa de cultivo a 37°C, ON.

Colony PCR: Se tomó parte de cada colonia a analizar mediante con un palillo estéril y se colocó en tubos con 10 µl de agua ultrapura y se incubaron a 100°C 10 minutos. Luego, se centrifugaron a 14.000 rpm 15 minutos, 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 universales (Tabla 3).

Primer		Secuencia	Tm°
CMV prom	Forward	5´CGCAAATGGGGCGGTAGGCGTG 3´	74°C
SV40 poly A	Reverse	5´CCTCTACAAATGTGGTATGG 3´	58°C

Tabla 3: Listado de primers universales para la realización de la colony PCR.

El perfil de ciclado que se utilizó fue el que se muestra en la Tabla 4.

Etapas	Temperatura	Tiempo	N° de Ciclos
Desnaturalización inicial	92°C	2 minutos	1
Desnaturalización	92°C	20 segundos	40
Annealing	57°C	20 segundos	
Extensión	72°C	1,5 minutos	
Extensión final	72°C	5 minutos	1

Tabla 4: Perfil de ciclado obtenido luego de la puesta a punto de las temperaturas y tiempos. Este fue el perfil utilizado para verificar la presencia o ausencia del inserto en los clones obtenidos.

Las colonias que presentaron amplificación de un fragmento del tamaño deseado fueron analizadas luego mediante la realización de un mapa físico.

Mapa físico: Se llevó a cabo una extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina y luego se incubó con la enzima de restricción SphI. La incubación fue a 37°C, ON y se utilizó el buffer que indicaba el fabricante. Luego, se analizó por corrida en gel de agarosa el patrón de bandas para identificar los clones que portaban las secuencias deseadas

VIII-9 Electroforesis de proteínas y Western blot

La de expresión de proteínas de las fracciones celulares se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida 12% por SDS-PAGE (Sambrook, J., Maniatis, T., & Fritsch, E.F., 1989). Se utilizó running buffer (Tris base 3 g/l; Glicina 14,4 g/l; SDS 10% p/v) y el equipo utilizado fue Mini-PROTEAN® de Bio-Rad. Se tomaron 15 µl de las fracciones celulares (muestra) y se adicionaron 5 µl de buffer de siembra (Tris.HCl 0,2 M pH 6,8; SDS 8% p/v; Glicerol 40% p/v; βmercaptoetanol 5% v/v; Azul de bromofenol 0,004% p/v). Para ver el perfil de expresión de proteínas uno de los geles fue teñido con una solución de tinción (Coomassie brilliant blue R250 0,25% m/v; Etanol 45% v/v; Ácido acético glacial 10% v/v) a temperatura ambiente (TA) ON. Para desteñir los geles se utilizó H₂O bidestilada. En todas las electroforesis se utilizaron marcadores de peso molecular Full Range Rainbow™ (GE Healthcare).

Una vez que se realizó la electroforesis, en otro de los geles se llevó a cabo la transferencia húmeda a una membrana de polifloruro de vinilideno (PVDF, Polyvinylidene fluoride) Inmun-Blot™ (Bio-Rad). La membrana se bloqueo con una solución de caseína 1% m/ ON en agitación y a 4°C. Luego de 3 lavados de la membrana con PBS + 0,1 % Tween-20, se incubó la misma con el anticuerpo primario (antisuero conejo anti-Z (Cherñac, F., 2006) (1:1000). Se incubó 1 hora a 37°C en agitación y a continuación se lavaron con PBS + 0,1% Tween-20. Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-conejo unido a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology) (1:1000). Se reveló la membrana con el reactivo Bio-lumina (PB-L), placas radiográficas TMat G/RA (Carestream) y soluciones de fijado y revelado (Romek).

VIII-10 Obtención de VLPz-Sag

Expresión y recolección de sobrenadantes

La correcta expresión del plásmido pZ-Sag14 transfectado en las células HEK 293T se evaluó por inmunocitoquímica con antisuero conejo anti-Z, como anticuerpo primario y anti-conejo como el secundario.

Durante los 5 días siguientes se colectaron los sobrenadantes de los cultivos que contienen las VLPs generadas. El último día de recolección se procesaron las células con el buffer de lisis y fueron almacenados a -20°C y rotulados adecuadamente hasta el momento de uso.

Purificación de VLPs

Luego de la transfección celular, los sobrenadantes obtenidos fueron colectados y se ultracentrifugaron en colchón de sacarosa (30% m/v) a 96.000 xg a 4°C por 1 hora. El sobrenadante fue descartado, y los pellets se resuspendieron en 400 µl de buffer PBS 1X y se almacenaron a 4°C. Las VLPs se trataron con 0,2 µl de proteinasa K (20 mg/ml), por 30 minutos a 37°C y luego se detuvo la reacción con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, Phenylmethylsulfonyl Fluoride) 1mM. Por último, fue ultracentrifugado en colchón de sacarosa bajo las mismas condiciones, el pellet resultante se resuspendió en 100 µl de PBS 1X.

VIII-11 Técnicas de biología celular

Transfección celular

La transfección se realizó sobre cultivos celulares con de 50-70% confluencia. El reactivo de transfección utilizado fue PEI87K (polietilenimina), adquirido al Departamento de Química Orgánica, perteneciente a la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (prestación de servicio N°21463). El protocolo fue seguido de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, se preparan 2 mezclas: una solución de medio DMEM sin aditivos con la cantidad de PEI correspondiente, otra con el ADN a transfectar (pZ-Sag), diluidos en NaCl 0,15 M (Tabla 5).

Placa de cultivo	DMEM	PEI	ADN	NaCl 0,15 M
T75	750 µl	35 µl	5-20 µg	85 µl
T25	250 µl	11,7 µl	1,7-6,7 µg	28,3 µl
Placa de 6 wells	100 µl	4,7 µl	0,7-2,7 µg	11,3 µl
Placa de 12 wells	50 µl	2,35 µl	0,5-2 µg	6 µl
Placa de 24 wells	25 µl	1,2 µl	0,2-1 µg	3 µl

Tabla 5: Cantidades de cada reactivo para las mezclas de transfección.

Ambas soluciones se incuban 10 minutos a TA y luego se mezclan, vertiéndose finalmente sobre la monocapa celular. El reactivo con el medio se mantiene por el tiempo determinado para la expresión de cada plásmido.

Maduración de células dendríticas in vitro

Se sembraron 100.000 células y se incubaron en presencia o ausencia de VLPz-Sag (100 ng/ml), SEB (10 µg/µl) y LPS (lipopolisacárido) (5µg/ml). Luego de 48 horas se obtuvieron las células y se marcaron con anticuerpos acoplados a fluorocromos para citometría de flujo.

Como control de pureza en la obtención de la VLPz-Sag se realizó una curva del efecto de las concentraciones 0, 1 y 10 µg/ml de polimixina B (Merck) en la maduración de las CDs en presencia de LPS (1 y 10 µg) y VLPz-Sag (1 y 10 µg). La polimixina B es una molécula que se une al LPS bloqueando su unión a los receptores celulares anulando así su capacidad de maduración de las CDs. Luego se identificaron diferentes marcadores celulares para analizar el efecto por citometría de flujo.

Inmunocitoquímica

Se plaquearon 250.000 CDs sobre cubreobjetos previamente polilisinados (Sigma-Aldrich) que se incubaron por dos horas a 37°C. Luego los tratamientos con VLPz-Sag (500 ng/ml) se hicieron en hielo y en flujo, en 4 tiempos (0, 10, 30 y 60 minutos). Se lavaron con PBS 1X y se fijaron con PFA (paraformaldehído) 4% 30 minutos. Se permeabilizó con Tritón X-100 al 0,1% por 15 minutos a TA. Luego, se bloqueó con PBS-BSA 5% por 30 minutos a TA. Se incubó en cámara húmeda con el anticuerpo primario diluido (1:500) en BSA 5% por 1 hora a 37°C. A

Los anticuerpos primarios empleados en este trabajo fueron:

- Anti-LAMP-1 (BD Pharmingen): es un monoclonal de rata para detectar LAMP-1 de origen ratón, rata o humano.
- Antisuero conejo-anti-Z: el cual se detalló en la sección Western Blot.

La incubación con el anticuerpo secundario (anti-rata conjugado a ficoeritrina (PE, Phycoerythrin) para detectar LAMP-1 y anti-conejo conjugado a cianina-2 (Cy-2, Cyanine) para detectar la proteína Z (dilución 1:500)) fue por 1 hora a 37°C. Luego se montaron con VECTASHIELD® (Vector Laboratories, Inc) los cubres y se dejaron secando ON en oscuridad. Se selló con esmalte y se dejó secar para luego poder visualizar los tratamientos en Microscopio Óptico Confocal Olympus FV1000 + FLIM ISS.

Medición de proliferación: CFSE

Las células en una concentración de 1×10^7 células/ml se marcaron con éster de succinimidilcarboxifluoresceína (CFSE, Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester) 7,5 nM y se incubaron 30 minutos a 37°C. Luego se agregó 10 ml de RPMI-SFB 10% y se centrifugó a 1.800 rpm por 10 minutos. El pellet se resuspendió con 10 ml de RPMI-SFB 10% y se incubó a 37°C en oscuridad por 5 minutos. Este paso se repitió 3 veces. Finalmente, las células fueron centrifugadas a 1.800 rpm por 10 minutos y fueron resuspendidas en medio RPMI completo. Los linfocitos ya marcados fueron adicionados a cultivos de CDs incubadas por 48 horas con diferentes tratamientos (VLPz-Sag 100 ng/ml). Luego de 5 días se recolectaron las células del cultivo y se centrifugaron a 1.800 rpm por 10 minutos. Se resuspendió el pellet en 150 μ l de ISOFLOW (BD Biodynamics), se pasaron por el citómetro de flujo y se analizaron los datos correspondientes.

Medición de apoptosis: Anexina V

CDs se incubaron con los tratamientos por 24hs y se agregaron los linfocitos. Luego de 5 días, se levantaron las células se centrifugaron 10 minutos a 1.800 rpm y el pellet se resuspendió en buffer Anexina V (HEPES/NaOH 0,01M pH 7,4; NaCl 14mM; CaCl₂ 2,5mM) + 0,3 μ l Anexina V-isotiocianato de fluoresceína (FITC, Fluorescein IsoTioCyanate) (1 μ l/ 1×10^6 células) por tubo. Posteriormente se homogeneizaron con vórtex y se incubaron 15 minutos en oscuridad, a TA y se realizó la medición por citometría de flujo.

Citometría de flujo

Las marcaciones se realizaron con anticuerpos monoclonales conjugados a los siguientes fluorocromos: fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), Cy-Chrome (Cy). Se utilizaron los siguientes anticuerpos de BD-Pharmingen (San Diego, CA, USA):

- a) Marcación de CDs: anti-CD11c(CY5), anti-MHC-I (PE), anti-MHC-II (FITC), anti-CD80 (FITC), anti-CD86 (PE).
- b) Marcación de linfocitos T: anti-CD4 (PE).
- c) Marcación específica de TCR: anti-V β 8 (FITC) anti-V β 14 (FITC).

Marcación de superficie: 1×10^6 células/ 1μ l de buffer de marcación (PBS, azida sódica 0,1% y SFB 3%) serán incubadas con 1μ g de anticuerpo durante 30-40 minutos, a 4°C y protegidas de

la luz. Las células serán lavadas dos veces y fijadas con PBS- paraformaldehído 0,5%, conservándose a 4°C y en oscuridad hasta el momento de la adquisición.

Las muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACScan. Se utilizaró el software CellQuest (BD Immunocytometry Systems) para el análisis de datos. Las células muertas se excluyeron basándose en los parámetros de tamaño (FSC) y complejidad (SSC) celular.

VIII-12 Análisis in vivo

Modelo tumoral subcutáneo y endovenoso

Para los ensayos realizados in vivo se trabajó con ratones de la cepa SCID/nod, a partir de la inoculación de 5×10^6 células de línea leucémica humana Jurkat (sólido: inoculación subcutánea, líquido: inoculación endovenosa). Luego de 3 semanas se trataron con PBS o SEE (50µg). Los tratamientos fueron inoculados intraperitonealmente por sujeción manual. El punto final del ensayo fue a las 6 semanas del comienzo del tratamiento.

Cálculo del volumen tumoral

Se calculó el volumen tumoral, una vez por semana durante 6 semanas en total, de acuerdo a la fórmula de Attia y Weiss (Attia, M.A.M. & Weiss, D.W., 1966) utilizando un calibre para hacer las mediciones. Volumen tumoral = $a \times b^2 \times 0,4$; donde a y b son los diámetros mayor y menor respectivamente. Dicha fórmula permite calcular el equivalente a la masa tumoral sin la eutanasia de los animales.

Ensayos de sobrevivencia

Los ratones previamente inoculados endovenoso con las células Jurkat, se trataron intraperitonealmente con 50 µg de Sag o PBS. Todos los estudios de supervivencia se realizaron de manera ciega y aleatoria. Los animales fueron monitoreados diariamente para la apariencia general y el cambio de peso. Los ratones que mostraron signos de dolor y sufrimiento fueron considerados haber logrado sus puntos finales y fueron sacrificados. El día de la muerte se consideró el día en que cada ratón fue sacrificado. La infiltración de células Jurkat (metástasis) a los ganglios linfáticos, el bazo y la médula ósea se examinó evaluando la presencia de linfocitos Vβ8+ por citometría.

Análisis de sangre

La sangre de los ratones fue colectada por punción submandibular. La toma de la muestra se realizó 1 vez por semana durante 6 semanas en total. El análisis de los componentes celulares de la sangre se realizó utilizando un coulter Junior Vet 5 calibrado (Abacus).

VIII-13 Análisis estadístico

Los niveles de significación estadística se determinaron utilizando la prueba t de Student o el análisis de varianza (ANOVA) seguido de las pruebas de Tukey. Los valores se expresaron como media \pm SE. Las diferencias se consideraban significativas cada vez que el valor p era ≤ 0.05 y un análisis de potencia del 95%. Se realizó una comparación de las curvas de supervivencia utilizando la prueba de log-rank con el software Prism. Las tasas de supervivencia se analizaron mediante la prueba χ^2 .

IX. Resultados

IX-1 Clonado molecular

Para el clonado molecular del ORF de la proteína Sag Balb-14, se comenzó realizando una PCR para poder obtener la secuencia codificante de la misma. Los primers específicos utilizados contienen en su secuencia sitios de enzimas de restricción (BamHI y NotI). El uso de enzimas de restricción distintas permitió la transferencia del inserto de forma direccionada al vector final. El vector que se utilizó para clonar el Sag fue pZ-eGFP, ya que este contiene la secuencia de la proteína Z del virus Junín capaz de formar la estructura de la VLP.

Tanto el amplicón del Sag Balb-14 obtenido, como el vector pZ-eGFP se incubaron con las enzimas BamHI y NotI. El vector pZ lineal, ya sin la secuencia de eGFP, se desfosforiló haciendo uso de la fosfatasa alcalina, para evitar religaciones. Luego, las 2 secuencias se ligaron utilizando la enzima ligasa del bacteriófago T4. El ORF de la proteína de fusión de interés, Z-Sag, quedó bajo la regulación del promotor CMV y la secuencia de poliadenilación SV40. El diseño experimental para obtener la construcción plasmídica de trabajo puede observarse en la Figura 1.

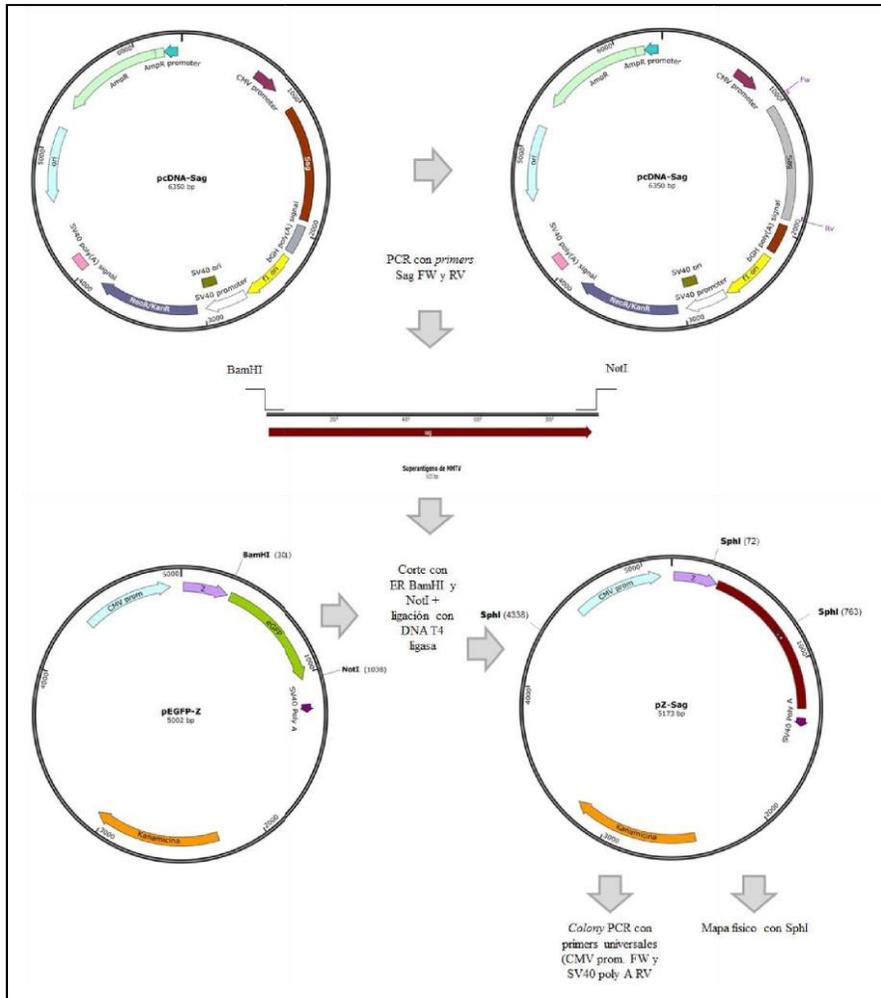


Figura 1: Estrategia molecular para la obtención de pZ-Sag. El gen Sag Balb-14 se muestra en color rojo; los primers Sag Balb-14 FW y Sag Balb-14 RV se muestran sobre el vector pcDNA3.1-Sag Balb-14, en color violeta. El ORF de la proteína de fusión de interés, Z-Sag quedó bajo la regulación del promotor CMV (mostrada en color celeste) y la secuencia de poliadenilación SV40 (mostrada en violeta).

Antes de realizar la amplificación mediante PCR se evaluó la integridad del plásmido purificado (Figura 2A). Luego se realizó la amplificación por PCR con los primers específicos y se verificó la presencia y el tamaño del amplicón por corrida electroforética en gel de agarosa. Se observó la presencia de un amplicón de 924 pb (Figura 2B).

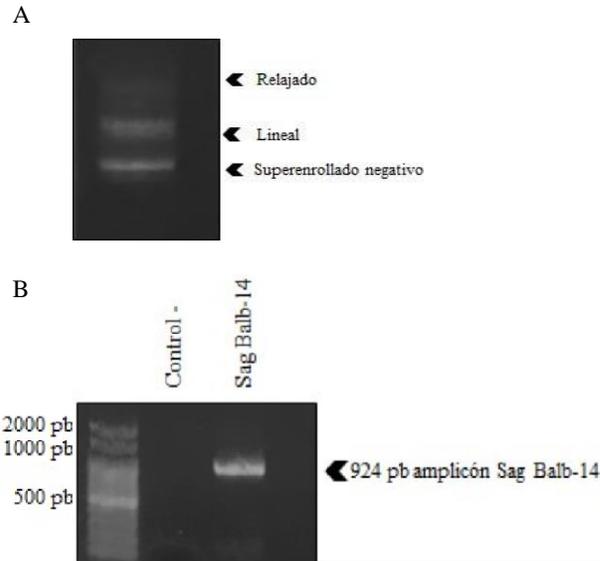


Figura 2: **A** Visualización de la integridad del plásmido pcDNA3.1-Sag Balb-14 mediante una electroforesis en gel de agarosa. Se pueden observar las tres conformaciones plasmídicas típicas: relajado, lineal y superenrollado negativo. **B** Amplificación del ORF de Sag Balb-14 con los primers Sag Balb-14 FW y RV utilizando como molde a pcDNA3.1-Sag Balb-14. La visualización del amplicón fue en un gel de agarosa. Se destaca el amplicón de 924 pb esperado luego de la PCR.

Luego, se purificó el plásmido pZ con miniprep por lisis alcalina para clonar el amplicón en el mismo. Se observó la integridad del plasmido obtenido (Figura 3A). Se realizaron las digestiones enzimáticas dobles con las enzimas BamHI y NotI, Se observaron los tamaños de 737 pb esperados de cortes (Figura 3B).

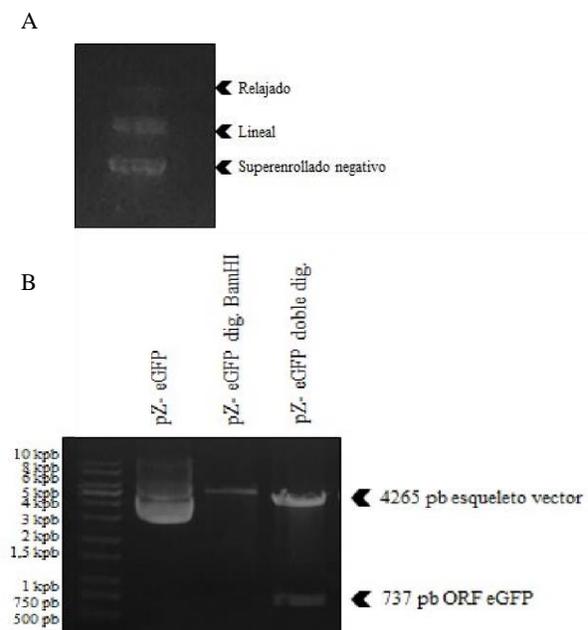


Figura 3: **A** Visualización de la integridad del plásmido pZ-eGFP mediante una electroforesis en gel de agarosa. Se puede observar las conformaciones plasmídicas típicas: relajado, lineal y superenrollado negativo, del pZ-eGFP. **B** Análisis en gel de agarosa para evaluar las digestiones enzimáticas realizadas con BamHI y NotI.

Para poder analizar los productos de las mismas se realizó una electroforesis en gel de agarosa. Una vez realizado esto, se procedió a la ligación de los productos, transformación de bacterias con el plásmido generado, plaqueo horizontal y luego un análisis de las colonias potencialmente positivas.

La electroforesis de los productos amplificados mostró fragmentos coincidentes con el tamaño esperado de 1369 pb en todos los 7 *pools*, correspondientes al ORF de fusión de la proteína Z y del Sag Balb-14. En la calle en la que se sembró la *colony* PCR de la única colonia obtenida de la ligación del inserto con el vector desfosforilado, se puede observar una banda de 1198 pb correspondiente a la ausencia del inserto esperado (Sag) (Figura 4 A)

Como todos los *pools* dieron positivo para el ORF del inserto, se seleccionaron 6 colonias al azar, de la placa en las que se habían repicado, y se realizó una purificación de ADN plasmídico mediante *miniprep* por lisis alcalina a partir de cultivos en medio LB líquido, suplementados con kanamicina 50 mg/ml y tetraciclina 10 ng/μl. Luego se realizó una digestión enzimática incubando ON a 37°C con la enzima SphI. Los productos de la digestión se sembraron en un gel de agarosa 0,8% p/v. Se pudo observar que para las colonias 1, 2, 3, 5 y 6 digeridas hay dos fragmentos de 4338 pb y 763 pb, los que indican presencia del ORF de la proteína de fusión, Z-Sag. En cambio, para la colonia 4 se observa una banda que indica que el vector se religó (Figura 4B).

Por otro lado, se analizaron las secuencias aminoacídicas con el programa Biomodel y se realizaron las estructuras tridimensionales de los mismos con el software I-TASSER. El análisis se realizó utilizando el programa PyMOL, en el cual se encontró que las estructuras tridimensionales no generaban cambios en comparación con las estructuras teóricas. (Figura 4C y D)

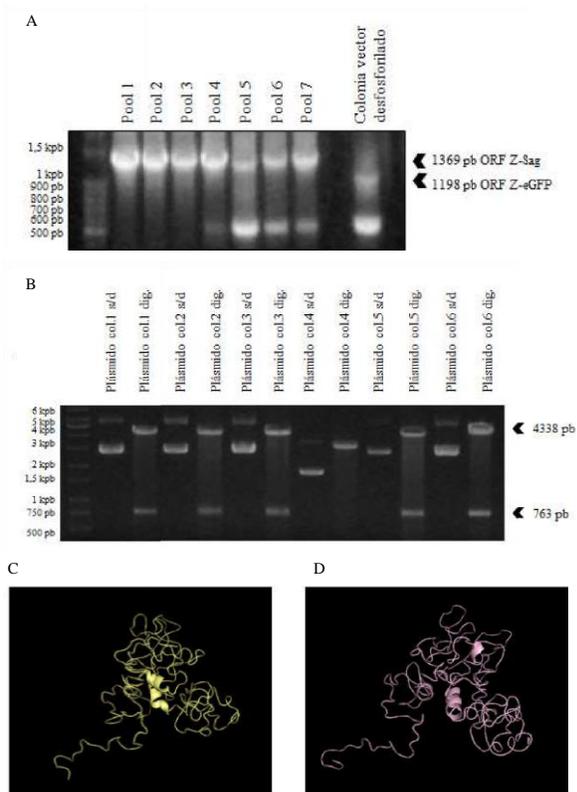


Figura 4: **A** Análisis por colony PCR de los posibles clones candidatos con primers universales. Se muestran los 7 pooles y la colonia obtenida con la ligación realizada luego de desfosforilar el vector. Se muestran indicados los fragmentos de 1369 pb y 1198 pb, correspondientes al ORF de Z-Sag y Z-eGFP, respectivamente. **B** Mapa físico, con la enzima SphI, de los plásmidos de algunas de las colonias seleccionadas (6 colonias). Se muestran indicados los dos fragmentos 4338 pb y 763 pb, los cuales corresponden al patrón de bandas esperado en caso de que se encuentre el ORF del Sag Balb-14 en el plásmido. **C** Estructuras tridimensionales obtenidas con el software I-TASSER de la proteína Z-Sag Balb-14 teórica y **D** Estructura 3D del clon 6 obtenido en este trabajo. La secuencia de este último se obtuvo por secuenciación.

IX-2 Expresión y purificación de VLPs

Para dar lugar a la generación de VLPz-Sag se procedió a la transfección del plásmido recientemente clonado, con el reactivo PEI87K, a un cultivo de células HEK 293T. Se corroboró la expresión del mismo mediante una inmunocitoquímica 48 horas post-transfección. Para la misma se utilizó como anticuerpo primario antisuero conejo-anti-Z, y como secundarios anti-conejo-Cy2 (Figura 5A).

Durante 5 días se recolectó los sobrenadantes de los cultivos en tubos cónicos de 50 ml, en los cuales se esperaba encontrar las VLPs generadas a partir de la expresión de Z. El último día de recolección las monocapas celulares, fueron procesadas con el buffer ProteJET Mammalian Cell Lysis Reagent dando como resultado lisados (fracciones celulares), los cuales fueron corridos en un gel de poliacrilamida 12% en condiciones desnaturizantes luego del tratamiento con la enzima proteinasa K (Figura 5B). El gel fue teñido con la solución de tinción Coomassie brilliant blue) para evaluar la presencia de las proteínas.

Además, a otro gel corrido en las mismas condiciones, el cual fue transferido a una membrana de PVDF, se le realizó un Western Blot. Para el mismo se utilizó un antisuero conejo-anti-Z, como

anticuerpo primario, y un anticuerpo anti-conejo unido a la enzima peroxidasa, como secundario. Puede observarse la presencia de Z-Sag, como una banda de 40 kDa (Figura 5C).

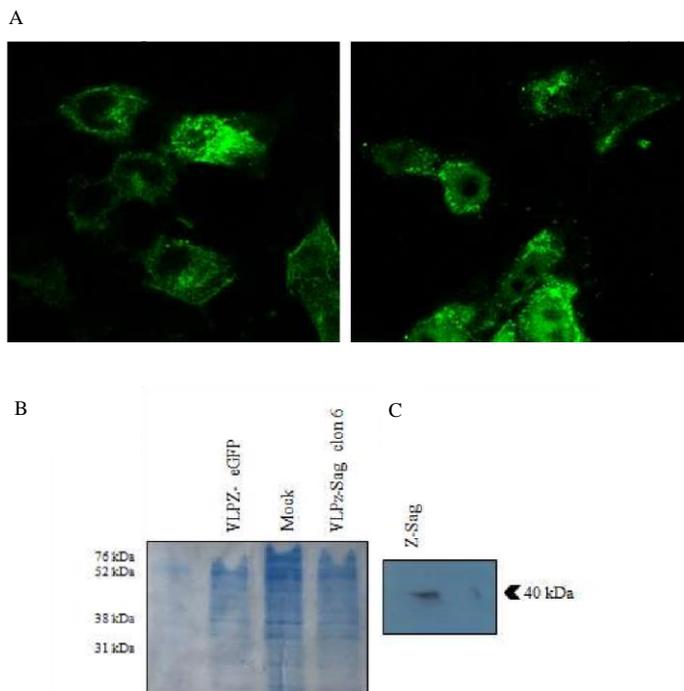


Figura 5: **A** Imágenes de la inmunocitoquímica realizada para ver la expresión de VLPz-Sag luego de 48 horas de expresión en dichas células. Las imágenes se obtuvieron por microscopía confocal. Aumento 60X.

B Controles de la producción de VLPs en células HEK 293T. A: Se muestra el SDS-PAGE luego de la electroforesis de las fracciones celulares tratadas con la enzima proteinasa K. **C** Western Blot de la fracción celular con antisuero conejo-anti-Z. Se observa una banda en el peso molecular esperado.

IX-3 Análisis de la capacidad de VLPz-Sag de generar maduración de CDs in vitro

Para analizar el efecto de VLPz-Sag sobre células presentadores de antígenos, se partió de CDs diferenciadas a partir de precursores de médula ósea de ratones Balb/c, haciendo uso de citoquinas recombinantes (IL-4 y GM-CSF) (Figura 6A). Se pudo observar una eficiencia de diferenciación fue de un 78% (Figura 6B).

Los ensayos se restringieron los estudios a la fracción celular que se encontraba en la región de CD11c⁺.

Se evaluó el efecto de las VLPsz-Sag sobre CDs, incubandolas con VLPz-Sag o LPS durante 48 horas, observarse un aumento en la expresión de las moléculas de MHC clase I y II (Figura 6C). El aumento de estas moléculas de superficie representa una mejora en la presentación antigénica de las células luego del contacto con VLPz-Sag. Esto se observó también con un aumento en la expresión de moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 (Figura 6D).

Dado que es muy común la contaminación del material de laboratorio con LPS. Se analizaron dos concentraciones de polimixina B (1 µg/ml y 10 µg/ml), incubadas con los tratamientos, antes de

ser expuestos a las células. Luego de 48 horas de incubación se midieron las expresiones de CD86 y MHC clase II (Figura 6E).

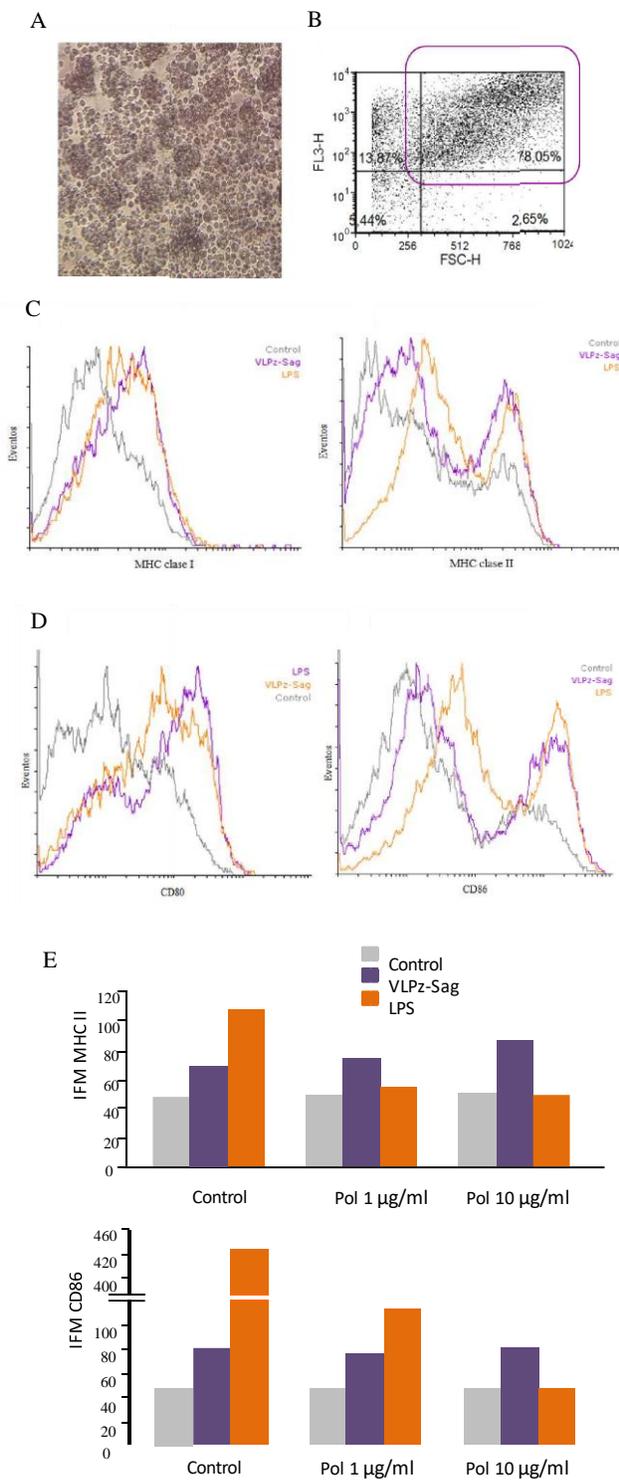


Figura 6: **A** Visualización del cultivo al microscopio óptico de precursores de médula ósea a CDs (60X). **B** Dot plot representativo indicando el porcentaje de células CD11c⁺. Las células fueron marcadas con el anticuerpo anti-CD11cPE-Cy5 y posteriormente se obtuvieron los resultados mediante citometría de flujo (FACS, Fluorescence-activated cell sorting). Se muestra la expresión de CD11c (FL3-H) en función del tamaño de las células (FSC-H). **C** Superposición de los histogramas representativos de Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) de MHC clase I y II tras la incubación con VLPz-Sag (violeta) o LPS (naranja). Se analizaron las células CD11c⁺. La expresión de MHC clase I (PE) y MHC clase II (FITC) se evaluaron por FACS, sobre 100.000 eventos. **D** Superposición de los histogramas representativos de IFM de CD80 y CD86 tras la incubación con VLPz-Sag (violeta) y LPS (naranja). Se analizaron las células CD11c⁺. La expresión de CD80 (FITC) y CD86 (PE) se evaluaron por FACS sobre 100.000 eventos. **E** Cuantificaciones de las IFM de A: MHC clase II (FITC) y B: CD86 (PE) obtenidas luego del análisis de la curva de polimixina B (0, 1 y 10 µg/ml). Se utilizaron CDs en cultivo diferenciadas de precursores de médula ósea de ratón Balb/c y luego se las maduró con VLPz-Sag y LPS por 48 horas.

IX-4 Efecto de VLP-Sag sobre los linfocitos específicos

Dado que la los Sag podrían inducir la proliferación de linfocitos, se evaluó La capacidad proliferativa de la VLP-Sag14 sobre lifocitos autólogos. Para esto, se midió niveles de CFSE 5 días post co-cultivo entre CDs maduras con VLPz-Sag y linfocitos obtenidos a partir de ganglio de ratones Balb/c. No se observa aumento en la proliferación de linfocitos autólogos por el tratamiento con VLPz-Sag (Figura 8A).

Se evaluó, a continuación, la capacidad de inducir la apoptosis de los mismos. Para esto, el co-cultivo fue marcado con Anexina V después de 5 días de tratamiento. Se observó un aumento en los niveles de Anexina V, indicando una activación de la apoptosis de células (Figura 8B). Para evaluar si el aumento de apoptosis observado era específico para los linfocitos reactivos al Sag transportado en la VLP, una vez maduras las CDs durante 24 horas, se agregaron los linfocitos del ratón y el co-cultivo fue mantenido por 5 días. Luego las células fueron recolectadas y marcadas con anticuerpos anti-CD4 y anti-V β 14 (específico para el Sag Balb-14 clonado). Se observó una disminución en los niveles de expresión de linfocitos CD4⁺/V β 14⁺, los cuales son específicamente reactivos a este Sag (Figura 8C). Al evaluar la expresión de linfocitos CD4⁺/V β 8⁺, los cuales no son reactivos para este Sag, no se apreciaron diferencias en los niveles de expresión (Figura 8D).

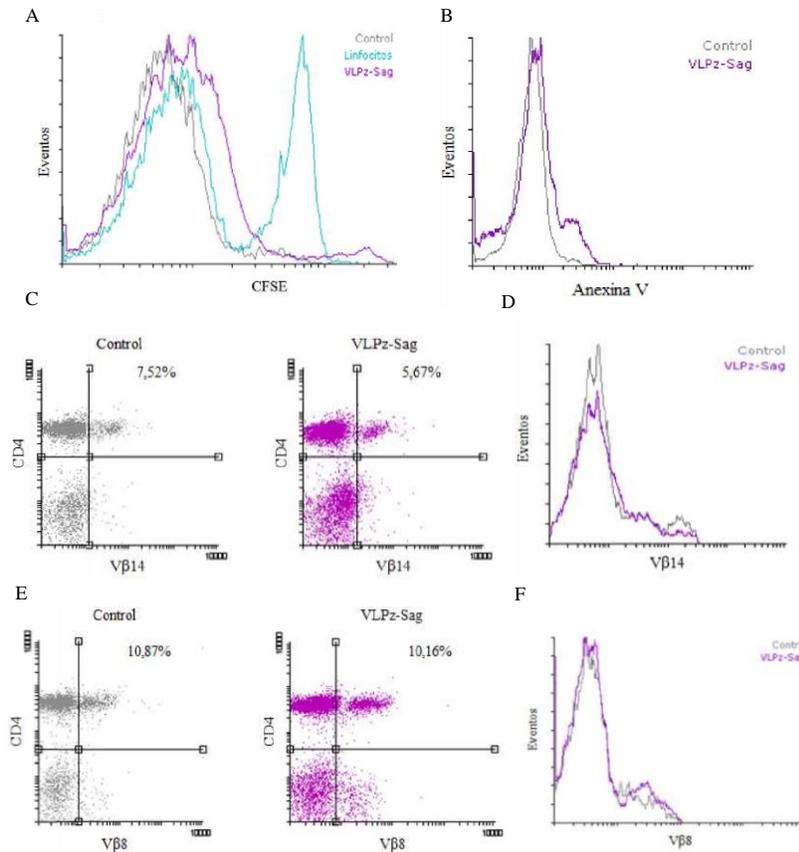


Figura 8: **A** Proliferación de los linfocitos. Superposición de los histogramas representativos de IFM de CFSE (FITC) pasados los 5 días de proliferación de los linfocitos obtenidos de ganglios de ratón Balb/c en co-cultivo con CDs diferenciadas a partir de precursores de médula ósea de la misma cepa. **B** Apoptosis de los linfocitos. Superposición de los histogramas representativos de IFM de Annexina V (FITC) pasados los 5 días del co-cultivo de los linfocitos obtenidos de ganglios de ratón Balb/c con CDs diferenciadas a partir de precursores de médula ósea de la misma cepa, previamente maduras con VLPz-Sag. Se adquirieron 20.000 eventos por FACS. **C** Dot Plot representativos de expresión de linfocitos CD4⁺/Vβ14⁺ luego del tratamiento con VLPz-Sag. Los linfocitos se mantuvieron en co-cultivo por 5 días con CDs previamente maduras con VLPz-Sag. Luego las células fueron marcadas con anticuerpos monoclonales para CD4 (PE) y Vβ14 (FITC) y adquiridas por FACS (100.000 eventos). **D** Superposición de los histogramas representativos de IFM de linfocitos CD4⁺/Vβ14⁺. **E** Dot Plot representativos de expresión de linfocitos CD4⁺/Vβ8⁺ luego del tratamiento con VLPz-Sag. Los linfocitos se mantuvieron en co-cultivo por 5 días con CDs previamente maduras con VLPz-Sag. Luego las células se marcaron con anticuerpos monoclonales para CD4 (PE) y Vβ8 (FITC) y fueron adquiridas por FACS. **F** Superposición de los histogramas representativos de IFM de linfocitos CD4⁺/Vβ8⁺.

IX-5 Efecto antieplásico de Sags in vivo

El See suprime el crecimiento tumoral en ratones NSG

Para determinar el efecto antieplásico de See in vivo, empleamos un modelo de xenoinjerto de células Jurkat en ratones NSG para detectar rápidamente la infiltración de tumores y linfocitos. Ratones NSG se inocularon subcutáneamente (S.C.) con células Jurkat, y 3 semanas después,

cuando se detectó la masa tumoral sólida, fueron o no tratados por vía intraperitoneal (i.p.) con Sag (Figura 9A). Después de eso, el crecimiento tumoral se midió una vez por semana durante 6 semanas. Encontramos que la inhibición del crecimiento tumoral comenzó a ser significativa a partir de la quinta semana en los ratones tratados con Sag (Figura 9B). Como se esperaba, las expresiones de V β 8 en las células tumorales se redujeron significativamente en ratones tratados con Sag (Figura 9C). Además, evaluamos las características apoptóticas ejercidas por Sag *in vivo* midiendo expresión de proteínas de la familia BCL-2.

El tratamiento dio un aumento en los niveles de ARNm de Bax y una disminución en los niveles de Bcl-2 en las células tumorales (Figura 9D). Este efecto también se observó en los niveles de las proteínas respectivas (Figura 9E).

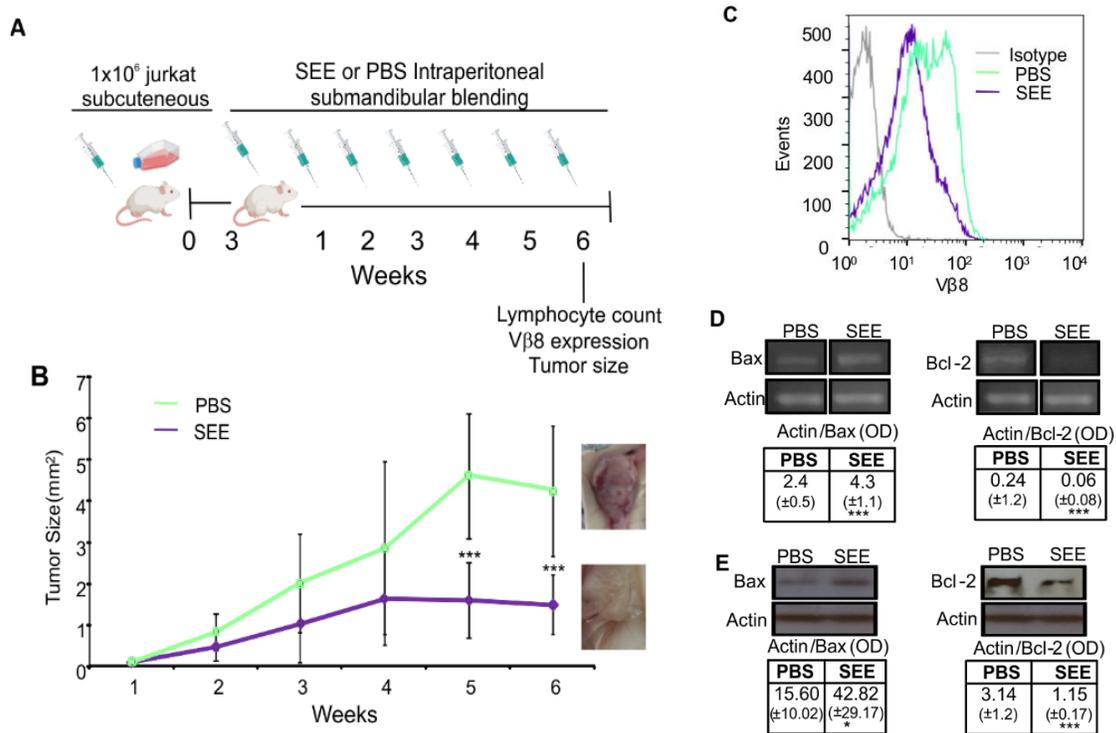


Figura 9: Sag reduce el tamaño del tumor en ratones induciendo apoptótico. (A) Esquema experimental (B) los volúmenes tumorales (** $P < 0.01$; PBS vs. Ver; $N = 6$). (C) Histograma representativo que muestra la expresión de la cadena V β 8 específica de TCR en las células tumorales del control y con Sag en el punto de tiempo final (d) una imagen representativa y cuantificación de los niveles de expresión de Bax y BCL-2 en células tumorales usando RT-PCR. Se presentan valores de densidad óptica (OD) (e) imágenes representativas de Western blot para los niveles de expresión de Bax y Bcl-2. La densidad óptica de las bandas se cuantificó y se normalizó a la actina. Se muestran los niveles relativos. (Bax: * $P < 0.05$ Ver vs. PBS; BCL-2: *** $P < 0.001$ Ver vs. PBS). Los datos se presentan como la media \pm SEM de tres experimentos independientes.

Los Sags reducen la infiltración de células neoplásicas a la sanguíneo

Para evaluar si ver el tratamiento podría prevenir la infiltración de linfocitos a la sangre, se tomo muestras de sangre submandibular semanal después de la inyección de See o PBS. Luego, los linfocitos de sangre se evaluaron por FACS y coulter hematológico. El tratamiento provocó una disminución en la infiltración de linfocitos neoplásicos en la sangre (Figura 10A) que se correlacionó con una regulación negativa de la expresión de V β 8 TCR (Figura 10B). En contraste, el resto de las poblaciones de sanguíneas no fueron alteradas (Figura 10C, D). Estos resultados demuestran que la apoptosis de las células neoplásicas inducidas por SAG en el tumor reduce la infiltración de células neoplásicas en la periferia.

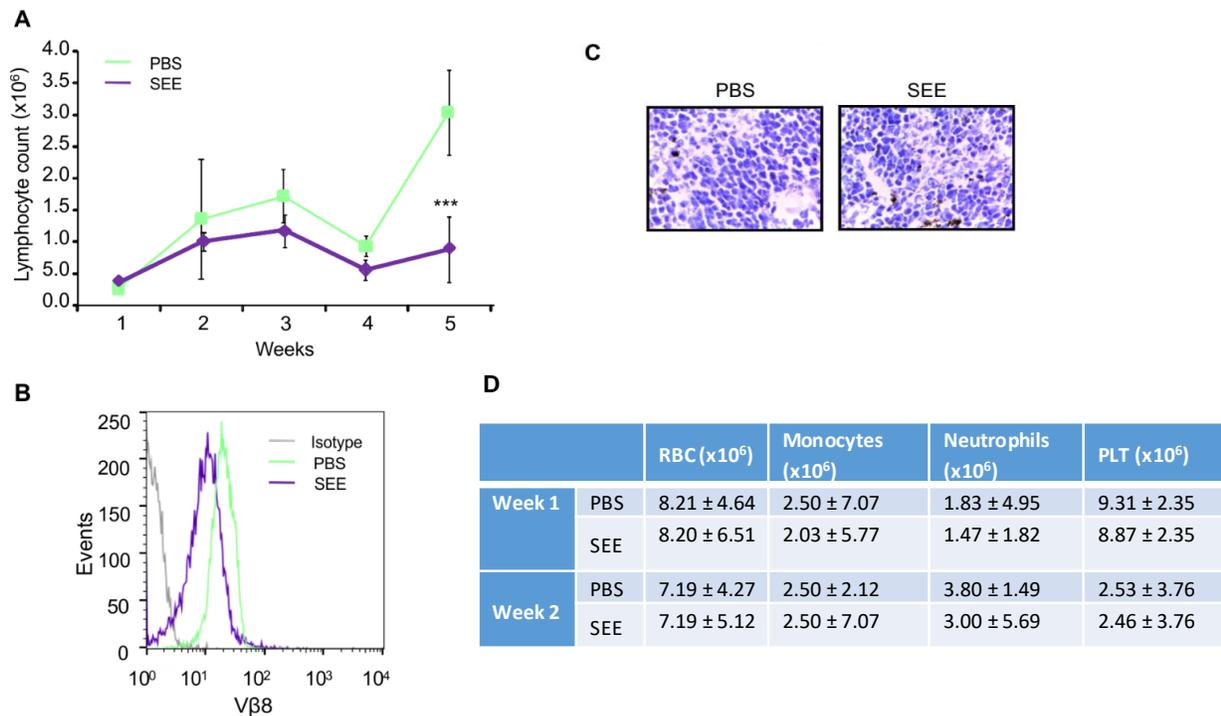


Figura 10: Sag reduce el número de linfocitos en sangre de ratones con células Jurkat de xenoinjerto. (A) Los recuentos de linfocitos se midieron en muestras de sangre 1 vez por semana durante 6 semanas usando un contador de Coulter (** P<0.01; PBS vs. Sag). (B) Histograma representativo de la expresión de la cadena V β 8 específica de TCR en la sangre del control y Sag después de 6 semanas (c) la tinción H&E del bazo de ratón no demostró cambios patológicos significativos entre el control y Sag. (D) cuantificación representativa de las poblaciones en sangre.

Los Sags aumentan la supervivencia de los ratones con células neoplásicas

Evaluamos si Sag podría mejorar la supervivencia de los ratones que transportan células T neoplásicas humanas que simulan la presentación clínica de la enfermedad. A este objetivo, las células Jurkat fueron inoculadas por vía intravenosa (i.v.), y 2 días después, los ratones comenzaron a tratarse con Sag o PBS cada 7 días (Figura 10A). Se demostró que los ratones tratados con Sag no experimentaron un aumento en los números de linfocitos, de hecho, hubo una disminución significativa en comparación con los ratones no tratados (Figura 10B). Además, los ratones no tratados mostraron una mayor pérdida de peso (Figura 10C) que anticipó su deterioro acelerado y muerte (Figura 10D). En efecto, en el día 42, mientras que todos los ratones de control habían muerto, alrededor del 70% de los ratones tratados aún permanecían vivos. En el punto final, el número de células V β 8⁺ fue significativamente mayor en ratones no tratados en comparación con los ratones tratados con Sag en bazo, ganglios linfáticos y sangre periférica, mientras que no se observaron diferencias significativas en la médula ósea (Figura 10 E). Además, en los ratones tratados con SEE con linfocitos neoplásicos residuales, se pudo observar una regulación negativa de la expresión de V β 8 TCR, lo que sugiere que la apoptosis ya se había desencadenado (Figura 10 F-G). No se observaron signos de toxicidad asociados con el tratamiento. Estos resultados indican que los Sag pueden extender significativamente la supervivencia de los ratones induciendo la apoptosis de los linfocitos T neoplásicos humanos restringidos a una cadena V β específica sin producir efectos secundarios no deseados.

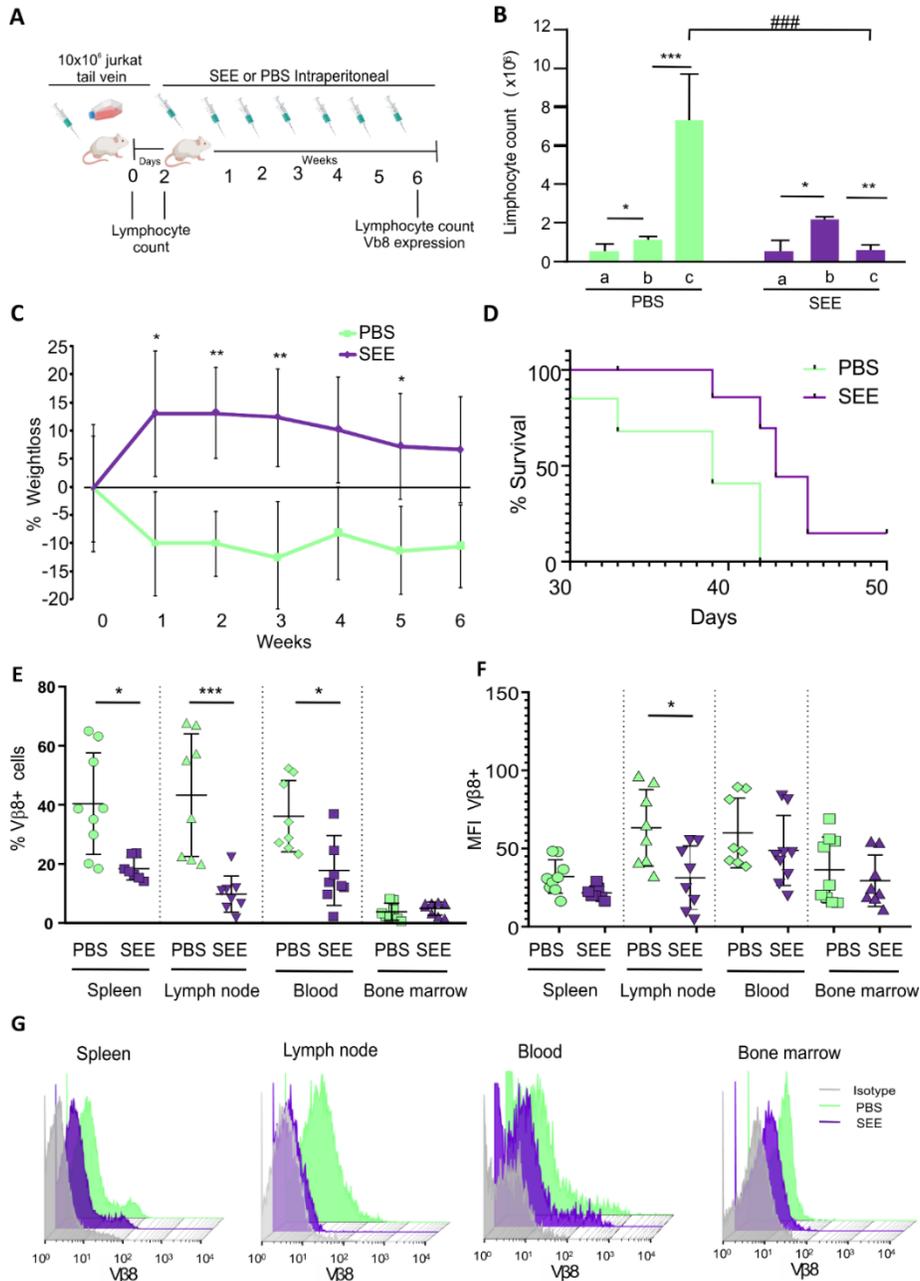


Figura 10: Ver aumenta la supervivencia de los ratones. (A) Se midieron los recuentos de linfocitos experimentales (B) los recuentos de linfocitos en la sangre del ratón antes de la inoculación de las células Jurkat (A), dos días después de la inoculación (B) y en el punto de tiempo final después del tratamiento (C). Los resultados se presentan como una cuantificación de los linfocitos (* $P < 0.05$; PBS A vs. PBS B; *** $P < 0.001$; PBS B vs. PBS C; * $P < 0.05$; Ver a Vs. Ver B; ** $P < 0.01$; ver B vs. Ver C; ### $P < 0.001$; PBS C vs. Ver C; $n = 9$). (C) Curva de pérdida de peso durante 6 semanas (* $P < 0.05$; PBS vs. Ver; ** $P < 0.01$; PBS vs. Ver). (D) Curva de supervivencia de ratones tratados con PBS o ver después de la inoculación de células Jurkat (*** $P < 0.0001$; PBS vs. Ver; $n = 9$) (e) Porcentaje de células Vβ8+ en bazo, ganglio linfático, sangre y sangre médula ósea de ratones tratados con PBS o ver (bazo: * $P < 0.05$ PBS vs. Ver; Nodo linfático: *** $P < 0.001$ PBS vs. Ver; Sangre: * $P < 0.05$ PBS vs. Ver). (F) intensidad de fluorescencia media de la expresión de Vβ8 en células de bazo, ganglios linfáticos, sangre y médula ósea de ratones tratados con PBS o ver; (* $P < 0.05$ PBS vs. Ver, ganglio linfático). (G) Histograma representativo de la expresión de Vβ8 en ratones tratados con PBS o ver en las células de bazo, ganglios linfáticos, sangre y médula ósea. Los datos se presentan como la media \pm SEM, $n = 9$.

También empleamos ratones SCID/Nod para evaluar el efecto de los Sags, se realizaron ensayos de supervivencia. Observamos que los ratones no tratados perdieron rápidamente peso (Figura 11A), con una tasa de supervivencia del 40% (Figura 11B). En particular, estos ratones también exhibieron un mayor número de células V β 8+ en el bazo, los ganglios linfáticos y la sangre periférica (Figura 11C-D). Estos resultados resaltan la importancia fisiológica del efecto antineoplástico de See, que sigue siendo significativo incluso en presencia de otras células mieloides residentes.

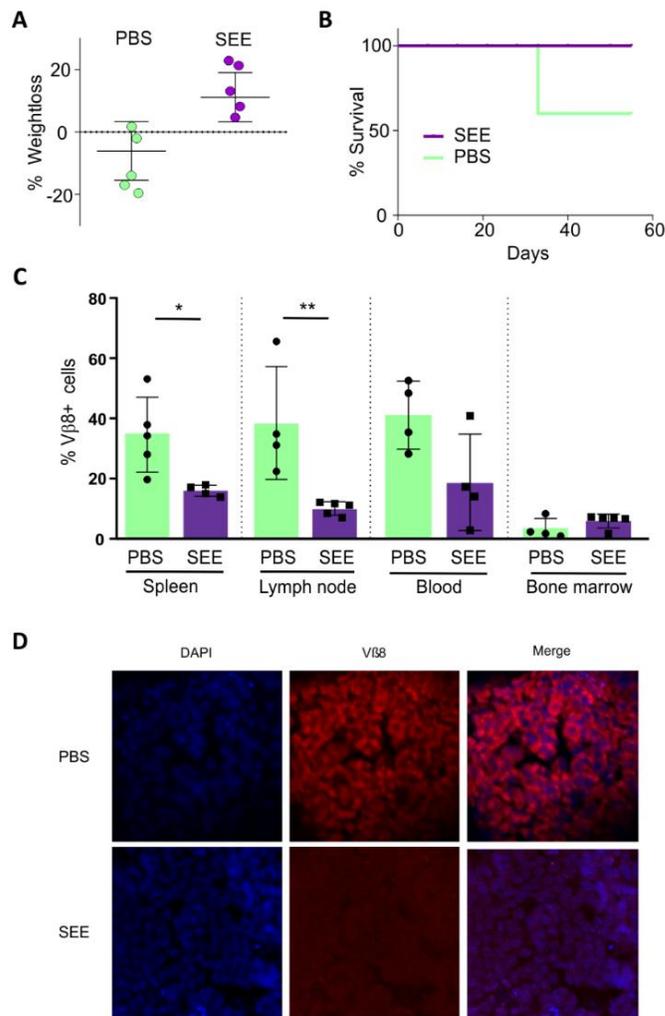


Figura 11: Sag aumenta la supervivencia de los ratones en ratones desnudos. Ratones tratados con PBS o ver después de la inoculación de células Jurkat (a) curva de pérdida de peso durante seis semanas (* $P < 0.05$; PBS vs. Ver; ** $P < 0.01$; PBS vs. Ver). (B) Curva de supervivencia durante seis semanas (** $P < 0.001$; PBS vs. Ver; $n = 9$) (c) Porcentaje de células V β 8+ en bazo, ganglios linfáticos, sangre y médula ósea de ratones tratados con PBS o ver (ver (Bazo: * $P < 0.05$ PBS vs. Ver; Nudo linfático: ** $P < 0.01$ PBS vs. Ver) (D) Inmunoquímica de la expresión de V β 8 en células de ganglios linfáticos de ratones tratados con PBS o ver. V β 8 (rojo), DAPI (azul).

X. Conclusión y discusión

Las VLPs recientemente han recibido gran atención debido al alto potencial que presentan dentro del campo médico en particular en el área de la nanomedicina (28). Estas construcciones son consideradas muy eficientes como plataformas para vacunas y sistemas de transporte de moléculas potencialmente terapéuticas (29). Particularmente, la proteína Z del virus Junín, un arenavirus americano, juega un rol importante en la generación de VLPs en ausencia de cualquier otra proteína viral (23). Estas estructuras pueden ser diseñadas para llevar moléculas específicas en el interior o en la superficie de las mismas. Su capacidad de cierre y las propiedades en la formación de vesículas hacen de estas moléculas posibles transportadoras de antígenos tanto en su interior como en la superficie de las VLPs (23).

En este trabajo focalizó en la realización de una VLP, a partir de la proteína Z, como molécula transportadora de Sags.

Como ya mencionamos antes, los Sags, proteínas de origen viral o bacteriano, se unen sin procesar a las moléculas de MHC clase II, por fuera del sitio de unión de antígenos convencionales para luego interactuar con las células T a través del dominio V β específico del TCR (30). Al comienzo, los estudios sobre los Sags describieron que muchos pueden estimular una respuesta proliferativa sobre células T en presencia de una célula presentadora que exprese MHC clase II (31). Estudios subsiguientes comenzaron a describir que los Sags no eran verdaderamente mitógenos para las células T murinas (32). Luego se describió que los Sags pueden generar una respuesta anérgica sobre los linfocitos T reactivos (33). A pesar de la contrariedad de resultados indicando la capacidad de los Sags de inducir tanto proliferación como apoptosis de células T, experimentos in vivo han demostrado que la exposición de ratones a Sags puede causar una proliferación de células T seguida luego por apoptosis (34).

Para uso terapéutico, los Sags fueron utilizados sólo para aumentar la inmunogenicidad de las células tumorales, fusionando diferentes enterotoxinas con la región Fab de anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos tumorales (13).

Demostramos tanto, in vitro como in vivo, que luego de la interacción de los linfocitos T neoplásicos reactivos con Sags específicos se produce la muerte por apoptosis. Se determinó también que al tratar con Sags a ratones portadores de leucemias T murinas agresivas aumentaba la sobrevivencia de los huéspedes al inducir apoptosis específica de las células tumorales, como consecuencia de la interacción del Sag con el TCR. Es de destacar que el tratamiento de ratones

portadores de neoplasias linfoides T con Sags, codificados por el MMTV, determinó más del 90% de remisión completa de la enfermedad (19).

Por los resultados previos del laboratorio, y en búsqueda de explotar la capacidad de los Sag de inducir apoptosis de células T, se comenzó con el clonado del Sag viral C3H, del virus MMTV, el cual tiene afinidad por la región V β 14 del TCR (25,26). El mismo se realizó de forma direccionada utilizando enzimas de restricción diferentes en los primers y se siguieron los protocolos estandarizados para su expresión y purificación (24).

Se describió que las VLPs mejoran la entrega, de los antígenos que transporta, a las APC, produciendo un aumento en la maduración de estas células (21,35). En concordancia con los resultados ya descritos para otras VLPs, en este trabajo se demostró que VLPz-Sag produce la maduración de CDs, diferenciadas a partir de precursores de médula ósea de ratón. Esto fue observado por un aumento en la expresión de las moléculas de superficie, MHC clase I y MHC clase II, y de las moléculas co-estimuladoras, CD80 y CD86.

El aumento de moléculas co-estimuladoras luego del ingreso de un antígeno a las CDs, se encuentra asociado a una mayor actividad de estas células, demostrando así un incremento en su funcionalidad. Para evaluar esta funcionalidad en estudios in vitro, se utilizó el ensayo de MLR, el cual permite correlacionar el aumento de expresión de moléculas co-estimuladoras en las CDs con un incremento en la proliferación de linfocitos heterólogos, indicando así un incremento en la actividad de CDs. A pesar de ver el acrecentamiento en la expresión de moléculas coestimuladoras en las CDs, luego de la incubación con VLPz-Sag, se observó que estas no producen un aumento en la proliferación de linfocitos heterólogos. Este resultado, contradictorio a lo esperado por lo descrito en otras VLPs (21,35), indica que la formación de la estructura conjunta de VLPz-Sag produciría un aumento en la expresión de las moléculas involucradas en la presentación antigénica sin aumentar la capacidad de activar linfocitos. En lo que involucra la finalidad de formación de complejos VLPz-Sag, se presenta como una ventaja ya que se busca una acción de los Sags, como inductor de apoptosis, sin que esté involucrada la activación y proliferación de linfocitos.

Por otro lado, se encuentra descrito que los Sags poseen la capacidad de activar e inducir la apoptosis de los linfocitos específicos (19). Cabe destacar que en la descripción de los Sags se encuentra la capacidad de los mismos de ser resistentes a proteólisis y al calor una vez endocitados por las CDs (36). Basados en la hipótesis de que los Sags clonados mantendrían la misma estructura y función que la proteína sin clonar, en este trabajo se evaluó si el Sag clonado en la VLP podría

mantener su función per se de inducción de apoptosis de los linfocitos reactivos. Demostramos aquí que al madurar CDs con VLPz-Sag y luego co-cultivarlas con linfocitos se produce una disminución en la expresión de los mismos, los cuales son $CD4^+/V\beta 14^+$. Este resultado es específico, ya que al analizar linfocitos que expresen otro $V\beta$, específicamente los $CD4^+/V\beta 8^+$ no se observaron cambios en los niveles de expresión. Se determinó también que esta disminución se asocia con un aumento en los niveles de apoptosis celular, medido por aumento en los niveles de Anexina V en los linfocitos reactivos.

Los resultados presentados hasta acá se indican como promisorios para la utilización de la nanopartícula VLPz-Sag como inductora de apoptosis de linfocitos reactivos. Sumado a que se encuentra descrito en diferentes especies, incluyendo al hombre, se ha observado que muchos linfomas T poseen un carácter mono u oligoclonal, en cuanto a la expresión de una región $V\beta$ determinada (37), esto permitiría ampliar los estudios a linfocitos neoplásicos, con previa tipificación de los mismos.

Por otro lado, Los pacientes con T-All recurrente tienen opciones terapéuticas limitadas y un pronóstico extremadamente pobre. Aunque se han propuesto una variedad de regímenes de quimioterapia de rescate, las tasas de respuesta son muy insatisfactorias y, en consecuencia, esta situación representa una necesidad clínica urgente y fundamental (38–40).

Hemos aprovechado una propiedad de Sags, a saber, su capacidad para inducir la apoptosis en ciertos subconjuntos de células T inmaduras a través de regiones $V\beta$ específicas. Sobre esta base, investigamos también el efecto de los Sags en las células T neoplásicas humanas en entornos in vivo. Utilizamos la línea celular Jurkat y como efector, utilizamos un Sag que interactúa específicamente con las células que expresan la región $V\beta 8$. Nuestros resultados demuestran la capacidad de inducir apoptosis en las células Jurkat implantadas subcutáneamente e intravenosamente en ratones NSG. NSG es uno de los animales de laboratorio más inmunodeficientes descritos hasta la fecha. Esta condición no solo hace que los ratones NSG sean buenos receptores para muchos cánceres humanos trasplantables, sino que también permite la reproducción fiel de su curso clínico, lo que significa que las observaciones realizadas en estos ratones podrían ser de valor predictivo para los casos clínicos.

La inducción de la apoptosis en las células Jurkat fue específica ya que ocurrió cuando usamos el Sag específico de $V\beta 8$. El inicio de la señalización apoptótica intracelular se correlacionó con la regulación descendente de la expresión de TCR de $V\beta 8$ de superficie y no requirió proliferación

celular, lo que sugiere que la apoptosis mediada por Sag no era un evento dependiente de la proliferación, sino un efecto primario.

El efecto apoptótico inducido por Sag en las células Jurkat fue terapéuticamente relevante. En efecto, el tratamiento redujo drásticamente la carga tumoral cuando las células leucémicas se implantaron subcutáneamente en ratones NSG, disminuyó la infiltración de las células neoplásicas en el torrente sanguíneo, el bazo y los ganglios linfáticos y, lo más importante, aumentó significativamente la supervivencia de los ratones que habían recibido leucémico células por la ruta intravenosa en un intento de imitar el curso natural de la enfermedad. Todos estos efectos se lograron sin el número de linfocitos leucémicos o normales que no habían aumentado ni en la sangre, ni en el bazo ni en los ganglios linfáticos. En realidad, ese número disminuyó en ratones tratados con Sag en comparación con los no tratados, lo que significa que el tratamiento no promovería la proliferación de células T maduras normales que es un efecto secundario perjudicial de muchos de los protocolos de tratamiento convencionales con Sags.

Los resultados presentados en este trabajo permiten proponer que la obtención de VLP como molécula transportadora de Sag permitiría primero mantener la función de la proteína intacta, induciendo la apoptosis de los linfocitos reactivos específicos. También permite abrir las puertas a la generación de una amplia variedad de Sags con posibilidad de ser clonados para la formación de la nanopartícula previa mutación de los mismos para la eliminación de la toxicidad de los mismos, ya que al mantener la función del Sag dentro de las VLP, estas últimas podrían favorecer la maduración de las APC aumentando el número de moléculas MHC II expuestas en la membrana y el Sag clonado podría unirse al TCR en su región específica e inducir la apoptosis de los mismos. Estos estudios conducirán a la posible implementación de una nueva herramienta terapéutica antitumoral novedosa, altamente específica para células T neoplásicas. La ventaja obtenida basada en su especificidad, es que permitiría eliminar clones específicos de células T sin afectar células T de otros clones.

XI. Agradecimientos

Este trabajo fue subsidiado por el Instituto Universitario de Ciencias de la Salud, Fundación H.A. Barceló, la Fundación para la Lucha contra la Leucemia (FUNDALEU) y La Agencia Nacional de Investigación Científica PICT START UP 2019-00018

En memoria de la Dra. Isabel Piazzón, quien comenzó con estos estudios y en base a ellos se realizó este trabajo.

XII. Bibliografía

1. Juliusson G, Hough R. Leukemia. *Prog Tumor Res* (2016) 43:87–100. doi: 10.1159/000447076
2. Zhang X, Shang W, Yuan J, Hu Z, Liu H, Jiang B, et al. Positive Feedback Cycle of TNF α Promotes Staphylococcal Enterotoxin B-Induced THP-1 Cell Apoptosis. *Front Cell Infect Microbiol* (2016) 6:1–11. doi: 10.3389/fcimb.2016.00109
3. Davis AS, Viera AJ, Mead MD. Leukemia: An overview for primary care. *Am Fam Physician* (2014) 89:731–738.
4. Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, Böttcher S, Ghia P, Zehnder JL, Lozanski G, Colomer D, Moreno C, Geuna M, et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* (2007)956–964. doi: 10.1038/sj.leu.2404584
5. Zhang Y, Xu W, Liu H, Li J. Therapeutic options in peripheral T cell lymphoma. *J Hematol Oncol* (2016) 9:37. doi: 10.1186/s13045-016-0267-0
6. Pui C, Sandlund JT, Pei D, Campana D, Rivera GK, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Razzouk BI, Howard SC, Hudson MM, et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia : results of Total Therapy Study XIIB at St Jude Children ' s Research Hospital. *Children* (2004) 104:2690–2696. doi: 10.1182/blood-2004-04-1616.Supported
7. Manal M, Chandrasekar MJN, Gomathi Priya J, Nanjan MJ. Inhibitors of histone deacetylase as antitumor agents: A critical review. *Bioorg Chem* (2016) 67:18–42. doi: 10.1016/j.bioorg.2016.05.005
8. Lukenbill J, Kalaycio M. Fludarabine: A review of the clear benefits and potential harms. *Leuk Res* (2013) 37:986–994. doi: 10.1016/j.leukres.2013.05.004
9. Lee SS, Jung SH, Ahn JS, Kim YK, Cho MS, Jung SY, Lee JJ, Kim HJ, Yang DH. Pralatrexate in Combination with Bortezomib for Relapsed or Refractory Peripheral T Cell Lymphoma in 5 Elderly Patients. *J Korean Med Sci* (2016) 31:1160–1163. doi: 10.3346/jkms.2016.31.7.1160
10. Diamantis N, Banerji U. Antibody-drug conjugates—an emerging class of cancer treatment. *Br J Cancer* (2016) 114:362–367. doi: 10.1038/bjc.2015.435
11. Buckstein R, Fraser G, Cheung M, Kukreti V, Kuruvilla J, Imrie K, Piliotis E, Pond G, Windsor

- J, Ghorab Z, et al. Alemtuzumab and CHOP Chemotherapy for the Treatment of Aggressive Histology Peripheral T Cell Lymphomas: A Multi-Center Phase I Study. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk* (2016) 16:18-28.e4. doi: 10.1016/j.clml.2015.11.008
12. Duvic M, Tetzlaff MT, Gangar P, Clos AL, Sui D, Talpur R. Results of a phase II trial of brentuximab vedotin for CD30+ cutaneous T-cell lymphoma and lymphomatoid papulosis. *J Clin Oncol* (2015) 33:3759–3765. doi: 10.1200/JCO.2014.60.3787
13. Dohlsten M, Abrahmsén L, Björk P, Lando PA, Hedlund G, Forsberg G, Brodin T, Gascoigne NR, Förberg C, Lind P. Monoclonal antibody-superantigen fusion proteins: tumor-specific agents for T-cell-based tumor therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1994) 91:8945–9. doi: 10.1073/pnas.91.19.8945
14. Herman a, Labrecque N, Thibodeau J, Marrack P, Kappler JW, Sekaly RP. Identification of the staphylococcal enterotoxin A superantigen binding site in the beta 1 domain of the human histocompatibility antigen HLA-DR. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1991) 88:9954–8. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=52845&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
15. Fernández MM, De Marzi MC, Berguer P, Burzyn D, Langley RJ, Piazzon I, Mariuzza RA, Malchiodi EL. Binding of natural variants of staphylococcal superantigens SEG and SEI to TCR and MHC class II molecule. *Mol Immunol* (2006) 43:927–938. doi: 10.1016/j.molimm.2005.06.029
16. Leder L, Llera A, Lavoie PMM, Lebedeva MI, Li H, Sékaly R-P, Bohach GA, Gahr PJ, Schlievert PM, Karjalainen K, et al. A mutational analysis of the binding of staphylococcal enterotoxins B and C3 to the T cell receptor β chain and major histocompatibility complex class II. *J Exp Med* (1998) 187:823–833. <http://jem.rupress.org/content/187/6/823.abstract>
17. Courreges M, Burzyn D, Nepomnaschy I, Piazzon I, Ross S. Critical role of dendritic cells in mouse mammary tumor virus in vivo infection. *J Virol* (2007) 81:3769–3777. doi: 10.1128/jvi.02728-06
18. Burzyn D, Rassa JC, Kim D, Ross SR, Piazzon I, Nepomnaschy I. Toll-Like Receptor 4-Dependent Activation of Dendritic Cells by a Retrovirus Toll-Like Receptor 4-Dependent Activation of Dendritic Cells by a Retrovirus. (2004) 78:576–584. doi: 10.1128/JVI.78.2.576
19. Mundiñano J, Berguer PM, Cabrera G, Lorenzo D, Nepomnaschy I, Piazzon I. Superantigens increase the survival of mice bearing T cell lymphomas by inducing apoptosis of neoplastic cells.

- PLoS One* (2010) 5:1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0015694
20. Lorenzo D, Duarte A, Mundiñano J, Berguer P, Nepomnaschy I, Piazzon I. A B-Cell Superantigen Induces the Apoptosis of Murine and Human Malignant B Cells. *PLoS One* (2016) 11:e0162456. doi: 10.1371/journal.pone.0162456
 21. Warfield KL, Bosio CM, Welcher BC, Deal EM, Mohamadzadeh M, Schmaljohn A, Aman MJ, Bavari S. Ebola virus-like particles protect from lethal Ebola virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) 100:15889–94. doi: 10.1073/pnas.2237038100
 22. Lin Y-L, Hu Y-C, Liang C-C, Lin S-Y, Liang Y-C, Yuan H-P, Chiang B-L. Enterovirus-71 Virus-Like Particles Induce the Activation and Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells through TLR4 Signaling. *PLoS One* (2014) 9:e111496. doi: 10.1371/journal.pone.0111496
 23. Goñi SE, Borio CS, Romano FB, Rota RP, Pilloff MG, Iserte JA, Tortorici MA, Stephan BI, Bilen MF, Ghiringhelli PD, et al. Expression and purification of Z protein from Junin virus. *J Biomed Biotechnol* (2010) 2010: doi: 10.1155/2010/970491
 24. Borio CS, Bilen MF, Argüelles MH, Goñi SE, Iserte JA, Glikmann G, Lozano ME. Antigen vehiculization particles based on the Z protein of Junin virus. *BMC Biotechnol* (2012) 12:80. doi: 10.1186/1472-6750-12-80
 25. Bhadra S, Lozano MM, Dudley JP. BALB/Mtv-Null Mice Responding to Strong Mouse Mammary Tumor Virus Superantigens Restrict Mammary Tumorigenesis. *J Virol* (2009) 83:484–488. doi: 10.1128/JVI.01374-08
 26. Golovkina T V, Piazzon I, Nepomnaschy I, Buggiano V, Vela MDEO, Ross SR. Generation of a Tumorigenic Milk-Borne Mouse Mammary Tumor Virus by Recombination between Endogenous and Exogenous Viruses. (1997) 71:3895–3903.
 27. Proft T, Zealand AN. Bacterial Superantigens Review. *Anal Cell Pathol (Amst)* (2003)1956403. doi: 10.1155/2018/1956403
 28. Surendiran A, Sandhiya S, Pradhan SC, Adithan C. Novel applications of nanotechnology in medicine. (2009)689–701.
 29. Jennings GT, Bachmann MF. Immunodrugs: Therapeutic VLP-based vaccines for chronic diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2009) 49:303–326. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-061008-103129
 30. Acha-Orbea H, MacDonald HR. Superantigens of mouse mammary tumor virus.

- AnnRevImmunol* (1995) 13:459–486.
31. Carlsson R, Fischer H, Sjogren HO. Binding of staphylococcal enterotoxin A to accessory cells is a requirement for its ability to activate human T cells. *J Immunol* (1988) 140:2484–2488. <https://www.jimmunol.org/content/140/8/2484.long>
 32. White J, Herman A, Pullen AM, Kubo R, Kappler JW, Marrack P. The V β -specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: Stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell* (1989) 56:27–35. doi: 10.1016/0092-8674(89)90980-X
 33. Heeg K, Gaus H, Griese D, Bendigs S, Miethke T, Wagner H. Superantigen-reactive T cells that display an anergic phenotype in vitro appear functional in vivo. *Int Immunol* (1995) 7:105–114. doi: <https://doi.org/10.1093/intimm/7.1.105>
 34. Kotzin BL, Leung DY, Kappler J, Marrack P. Superantigens and their potential role in human disease. *Adv Immunol* (1993) 54:99–166.
 35. O’Hagan DT, Singh M. Microparticles as vaccine adjuvants and delivery systems. *Expert Rev Vaccines* (2003) 2:269–283. doi: 10.1586/14760584.2.2.269
 36. Langley RJ, Ting YT, Clow F, Young PG, Radcliff FJ, Choi JM, Sequeira RP, Holtfreter S, Baker H, Fraser JD. Staphylococcal enterotoxin-like X (SEIX) is a unique superantigen with functional features of two major families of staphylococcal virulence factors. *PLoS Pathog* (2017) 13: doi: 10.1371/journal.ppat.1006549
 37. Langerak a W, van Den Beemd R, Wolvers-Tettero IL, Boor PP, van Lochem EG, Hooijkaas H, van Dongen JJ. Molecular and flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire for clonality assessment in mature TCRalpha beta T-cell proliferations. *Blood* (2001) 98:165–173. doi: 10.1182/blood.V98.1.165
 38. Litzow MR, Ferrando AA. How I treat T-cell acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood* (2015) 126: doi: 10.1182/blood-2014-10-551895
 39. Forsberg G, Ohlsson L, Brodin T, Björk P, Lando PA, Shaw D, Stern PL, Dohlsten M. Therapy of human non-small-cell lung carcinoma using antibody targeting of a modified superantigen. *Br J Cancer* (2001) 85: doi: 10.1054/bjoc.2001.1891
 40. Heidary MF, Hosseini HM, Aghdam EM, Nourani MR, Ranjbar R, Mirnejad R, Fooladi AAI. Overexpression of metastatic related MicroRNAs, Mir-335 and Mir-10b, by staphylococcal enterotoxin B in the metastatic breast cancer cell line. *Adv Pharm Bull* (2015) 5: doi: 10.15171/apb.2015.035.