



Evaluación preliminar de las propiedades inmunomoduladoras de jerdostatina, una proteína derivada del veneno de serpiente

Ignacio García Nuñez

**Tutora: Dra. Teresa Freire
Laboratorio de Inmunomodulación y Vacunas
Facultad de Medicina, UdelaR**

**Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas
(opción Biología Celular y Molecular)**

PEDECIBA

2026

Quisiera agradecer en primera instancia a la Dra Teresa Freire, quien muy amablemente me abrió las puertas de su laboratorio. Teresa me apoyó y guió en esta travesía para poder estudiar derivados del veneno de serpiente, saliendo de su zona de confort, pero muchas veces compartiendo mi entusiasmo. Le estoy muy agradecido por esta oportunidad y ofrecerme las herramientas necesarias para seguir formándome como investigador.

Al Dr. Martín Fló, por involucrarse en este proyecto, aportando nuevas ideas y alternativas junto con su disposición y amabilidad constantes. Su ayuda y orientación fueron muy importantes para el avance de esta tesis.

También quiero darle las gracias al Dr. Federico Carrión, por colaboración en este trabajo, particularmente con la expresión en células S2. Y a todos los integrantes del Laboratorio de Inmunovirología del Institut Pasteur, en especial a Mariana Salinas y Nicole Gebelin.

Agradecer al Prof. Johannes Eble y a su equipo en Münster por acogerme durante tres meses en su laboratorio, con quienes compartimos no solo conocimiento científico, también conocimientos culinarios y culturales. Quisiera destacar y agradecer especialmente la ayuda y amistad del Dr. Jimmy Villalta Villalobos y de Eduardo Gutseit.

A mis compañeros del LIMV, por numerosas instancias de mesada y de escritorio, por intercambiar ideas, protocolos y discutir resultados. Fueron en todo momento de suma importancia para mi formación como investigador. Particularmente quiero agradecer a Vale. Su ayuda fue un pilar indispensable para el desarrollo y avance de este proyecto, incluso desde antes de su inicio.

Gracias a mis amigos por siempre estar ahí, en las buenas y en las malas, compartiendo logros y acompañando en los fracasos. El Nene, La Tapada, Hernie, Pablito, Felipe, Leo, Bastian y Adrián, siempre listos para reír y divertirnos, pero también para dar una mano en tiempos difíciles. A Camila, por todo su cariño y compañía. Por su actitud entusiasta, siempre con una sonrisa y mucha energía. A Pulgoso, que me acompañó incontables días y noches de estudio.

Quiero agradecer a mis padres por su apoyo incondicional, creer en mí y respaldarme.

Como casi todo en la Ciencia, este trabajo no es sino el resultado de la colaboración de muchos participantes, directos e indirectos, que me brindaron su ayuda y/o conocimiento. Muchas gracias a todos ellos, sin su colaboración, este trabajo no hubiera sido posible.

Este proyecto fue financiado por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación, en el marco del Programa de Becas de Posgrado Nacional.



Resumen

La jerdostatina es una desintegrina corta con motivo RTS que fue descubierta a partir de una librería de ADNc de la glándula de veneno de *Protobothrops jerdonii*. Su motivo de unión RTS (Arg, Thr, Ser) le permite reconocer específicamente a la integrina $\alpha 1\beta 1$, bloqueando su interacción con el colágeno IV de la membrana basal. Como receptor del colágeno, la integrina $\alpha 1\beta 1$ media la adhesión y migración celular, por lo que la jerdostatina se ha propuesto como un potencial agente antiangiogénico y antitumoral. Sin embargo, hasta ahora no se habían realizado ensayos en células del sistema inmune.

Las células dendríticas, son las células presentadoras de antígeno por excelencia. Además de actuar como células centinelas, son fundamentales para la activación de linfocitos T vírgenes, activando y dirigiendo la respuesta inmune adaptativa, pero también son las encargadas de mediar la tolerancia inmunológica. a presente tesis de Maestría tuvo como objetivo la producción recombinante de la jerdostatina y evaluar su posible efecto inmunomodulador sobre la maduración y activación de las células dendríticas, con el fin de avanzar en la investigación de su posible aplicación terapéutica.

Durante el desarrollo de esta Maestría se logró expresar la jerdostatina en *E. coli*, como proteína de fusión, que luego fue escindida por proteólisis. Se obtuvo un rendimiento de 0,56 mg/L de cultivo, un valor esperado según lo reportado en la literatura. Mediante inmunoensayos se comprobó que la jerdostatina recombinante fue capaz de unirse a su ligando, la integrina $\alpha 1\beta 1$. Sin embargo no pudimos confirmar su capacidad de bloquear la unión entre la integrina $\alpha 1\beta 1$ y el colágeno IV.

Al evaluar su potencial inmunomodulador, la jerdostatina recombinante demostró la capacidad de inhibir la expresión de las moléculas coestimuladoras CD40 y CD86, además de MHCII y citoquinas proinflamatorias inducidas por ligandos de TLR, en células dendríticas. Por lo tanto, nuestros resultados indican que la jerdostatina inhibe la maduración de las células dendríticas en las condiciones estudiadas.

Este trabajo revela entonces, un nuevo efecto de la jerdostatina, en vistas de su potencial aplicación como agente terapéutico.

Índice de abreviaturas

3FTX	-----	Toxinas de tres dedos
ADN	-----	Ácido desoxirribonucleico
ARN	-----	Ácido ribonucleico
APC	-----	Célula presentadora de antígenos
BCA	-----	Ácido bicinconínico
BMDC	-----	Células dendríticas derivadas de médula ósea
BSA	-----	Seroalbúmina bovina
CAM	-----	Membrana corioalantoidea
CB3	-----	Fragmento derivado del bromuro de cianógeno
CHO	-----	Células de ovario de hámster chino
CLR	-----	Receptores de lectina tipo C
CRISP	-----	Proteínas ricas en cisteínas
CTL	-----	Lectinas tipo-C
DAMPs	-----	Patrones moleculares asociados al daño
DC	-----	Célula dendrítica
DIS	-----	Desintegrina
DTT	-----	Ditiotreitol
EDTA	-----	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	-----	Factor de crecimiento endotelial
ELISA	-----	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
EMA	-----	Agencia Europea de Medicamentos
FDA	-----	Administración de Alimentos y Medicamentos de USA
FAK	-----	Kinasa de adhesión focal
GM-CSF	-----	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GST	-----	Glutación S-transferasa
HEPES	-----	Ácido 2-(4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil) etanosulfónico
His-6x	-----	Etiqueta de poli-histidina
HRP	-----	Peroxidasa de rábano picante
HUVEC	-----	Células endoteliales de la vena umbilical humana
ICAM	-----	Moléculas de adhesión intercelular
IL	-----	Interleuquina
IMAC	-----	Cromatografía de afinidad de metales inmovilizados
INF-γ	-----	Interferón gamma
IPMon	-----	Institut Pasteur de Montevideo
IPTG	-----	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
Jerdo-Ec	-----	Jerostatina recombinante producida en <i>Escherichia coli</i>
Jerdo-Dm	-----	Jerostatina recombinante producida en <i>Drosophila melanogaster</i>
KUN	-----	Péptidos kunitz
LAO	-----	L-aminooxidasas

LB	Caldo de lisogenia
LT	Linfocito T
MBP	Proteína de unión a maltosa
MEC	Matriz extracelular
MHCII	Complejo mayor de histocompatibilidad
MIDAS	Sitio de adhesión dependiente de iones metálicos
MPM	Marcador de peso molecular
NC1	Dominio C-terminal globular no colagenoso-1
NFkB	Factor nuclear kB
NMR	Resonancia magnética nuclear
NP	Péptidos natriuréticos
OD₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
ON	<i>Overnight</i> (toda la noche)
OPD	O-fenilendiamina
PAM	Pam3CSK4
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Buffer fosfato salino
PFUS-EC	Proteína de fusión expresada en <i>Escherichia coli</i>
PIC	Poly I:C
PLA₂	Fosfolipasas A ₂
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
PSI	Dominio Plexin-semaphorin-integrin
S2	Células Schneider-2 de <i>D. melanogaster</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
SVMP	Metaloproteasas del veneno de serpiente
SVSP	Serinoproteasasa del veneno de serpiente
SUMO	Pequeña proteína modificadora similar a ubiquitina
TA	Temperatura ambiente
TB	Caldo <i>Terrific</i>
TBS	Buffer tris salino
TEMED	Tetrametiletildiamina
TEV	Proteasa del virus del grabado del tabaco
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
Th	Linfocito T colaborador
TLR	Receptores tipo Toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Linfocito T regulador

TrxA ----- Tiorredoxina A
VCAM ----- Molécula de adhesión celular vascular
VEGF ----- Factor de crecimiento del endotelio vascular
Zimo ----- Zymosan

Índice

Resumen	5
Índice de abreviaturas.....	6
Índice	9
1. Introducción	11
1.1 Venenos de serpiente como fuente de moléculas bioactivas	11
1.1.1 Veneno de serpiente: composición y utilidad.....	11
1.1.2 Desintegrinas: definición, estructura y funciones biológicas.....	12
1.1.3 Jerдостatina: una desintegrina corta RTS del veneno de serpiente.....	17
1.2 La superfamilia de las integrinas	21
1.3 Células dendríticas: características y funciones	26
1.3.1 Expresión de integrinas por DC.....	31
1.4 Producción recombinante de proteínas de veneno: desafíos y estrategias	33
2. Hipótesis y objetivos	36
2.1 Hipótesis general:.....	36
2.2 Objetivo general:.....	36
2.3 Objetivos específicos:.....	36
3. Materiales y Métodos	37
3.1 Producción Recombinante	37
3.1.1 Plásmidos.....	37
3.1.2 Producción recombinante de jerdostatina en sistema heterólogo bacteriano (Jerdo-Ec).....	37
3.1.3 Producción recombinante de jerdostatina en un sistema heterólogo eucariota (Jerdo-Dm).....	41
3.1.4 Producción recombinante de la integrina $\alpha 1\beta 1$	43
3.2 Purificación de proteínas recombinantes	44
3.2.1 Jerdo-Ec.....	44
3.2.2 TEV.....	44
3.2.3 Integrina $\alpha 1\beta 1$	44
3.3 Análisis de proteínas	46
3.3.1 Cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinónico.....	46
3.3.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.....	46
3.3.3 Dot blot.....	47
3.3.4 Western blot.....	47
3.3.5 Espectrometría de masas.....	48
3.4 Ensayos de interacción	49
3.4.1 Unión de integrina $\alpha 1\beta 1$ al colágeno y CB3.....	49
3.4.2 Unión de jerdostatina a la integrina $\alpha 1\beta 1$	49
3.4.3 Bloqueo de la unión integrina $\alpha 1\beta 1$ - colágeno IV.....	50
3.5 Ensayos con DC	51
3.5.1 Maduración y activación de DC.....	51
3.5.2 Citometría de flujo.....	51
3.5.3 ELISA sándwich para la cuantificación de citoquinas.....	52

4. Resultados.....	54
4.1 Producción recombinante de jerdostatina en sistema heterólogo bacteriano..	54
4.2 Producción recombinante de jerdostatina en sistema heterólogo eucariota....	60
4.3 Producción recombinante de integrina $\alpha 1\beta 1$.....	63
4.4 Ensayos de interacción.....	65
4.4.1 Unión de integrina $\alpha 1\beta 1$ al colágeno y CB3.....	66
4.4.2 Unión de jerdostatina a la integrina $\alpha 1\beta 1$	67
4.4.3 Inhibición de unión integrina - colágeno por Jerdo-Ec.....	68
4.5 Análisis de las propiedades inmunomoduladoras de Jerdo-Ec sobre DC.....	69
4.5.1 Maduración y activación de DC.....	69
4.5.2 Evaluación de la expresión de moléculas de coestimulación.....	70
4.5.3 Evaluación de las citoquinas secretadas por CD maduras.....	77
5. Discusión.....	80
5.1 Expresión y purificación de proteínas recombinantes.....	82
5.1.1 Producción y purificación de jerdostatina recombinante en E. coli.....	82
5.1.2 Producción de jerdostatina recombinante en D. melanogaster.....	85
5.2 Ensayos funcionales de Jerdo-Ec.....	88
5.3 Efectos moduladores de Jerdo-Ec sobre DC.....	91
5.4 Perspectivas.....	95
Bibliografía.....	98

1. Introducción

1.1 Venenos de serpiente como fuente de moléculas bioactivas

1.1.1 Veneno de serpiente: composición y utilidad

Las serpientes son animales vertebrados saurópsidos, cuyas principales características son el cuerpo cubierto de escamas y la ausencia de patas ¹. Si bien este orden cuenta con numerosas familias, solo algunas de ellas son venenosas: *Viperidae*, que incluye a las serpientes de cascabel y “víboras” como la “cruquera”; *Elapidae*, donde se encuentran las serpientes de coral, las cobras y las mambas, entre otras; y *Colubridae* (las culebras) una extensa familia de serpientes que no suelen ser de importancia médica, pero con ejemplares que sí son peligrosos para el hombre ¹. Los venenos de serpiente son mezclas de diversas moléculas, principalmente péptidos y proteínas, que tienen por finalidad inmovilizar y/o matar a la presa ².

Estos compuestos son el resultado de millones de años de evolución por presión selectiva y selección natural. Si bien los venenos pueden variar en composición, sus funciones están dirigidas a interferir con los procesos biológicos que hacen posible la vida de la víctima, no siempre con resultados fatales ².

La composición del veneno de estos reptiles varía no sólo según la especie, sino también entre los ejemplares de una misma especie, según dieta y otros factores ³. No obstante, la proteómica ha demostrado que los grupos predominantes son; las fosfolipasas A2 (PLA₂), seguidas por las metaloproteasas (SVMP), las toxinas de tres dedos (3FTx) y las serinoproteasas (SVSP) ^{2,3}. Además de las cuatro mencionadas, existen otras familias que le siguen en preponderancia; L-aminoxidasas (LAAO), proteínas ricas en cisteínas (CRiSP), lectinas tipo C (CTL), las desintegrinas (DIS), los péptidos kunitz (KUN) y los péptidos natriuréticos (NP) ⁴. Además de cómo varía la presencia y abundancia de estas familias de toxinas en el veneno, las diferentes proteínas pueden presentar diversas isoformas que generan más versatilidad a los efectos biológicos que puedan causar estos compuestos ^{3,4}.

La presencia y representación de las distintas proteínas es lo que determina el efecto fisiopatológico que el veneno tendrá en un organismo ². En base a esto se pueden clasificar los venenos como hemorrágico, miotóxico, citotóxico o neurotóxico, según sus principales blancos moleculares ^{2,4}. Los venenos hemorrágicos atacan principalmente el sistema cardiovascular. Los miotóxicos destruyen el músculo esquelético. Aquellos que interfieren predominantemente con la fisiología celular son los citotóxicos. Por último, si afectan las neuronas motoras de la unión neuromuscular, entonces es un veneno neurotóxico ^{2,4}.

Es así que, gracias a su variada composición de péptidos y proteínas, los venenos pueden constituir bibliotecas de compuestos moleculares donde cada una de estas moléculas tiene uno o más blancos específicos, lo que las convierte en potenciales herramientas biotecnológicas ^{3,4,5}. A partir del estudio de los venenos de serpiente, se ha logrado aislar diversos componentes activos de los venenos de serpiente, utilizándolos para el estudio y desarrollo de herramientas moleculares y para el diagnóstico y tratamiento de diversas patologías, como la hipertensión o el cáncer ^{3,5}. Como ejemplo, a partir del veneno de *Bothrops jararaca* se desarrolló el Captopril, una droga utilizada para tratar la hipertensión ^{3,5}. Fue la primera droga aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y la Asociación Europea de Medicamentos (EMA), basada en un componente bioactivo del veneno de serpiente, en los años 80 ^{3,5}. Existen otros fármacos aprobados para el tratamiento de síndromes coronarios agudos, como Tirofiban y Eptifibatida, basados en Echistatina y Barbourina, dos péptidos de la familia de las desintegrinas, entre otros ^{3,5}.

1.1.2 Desintegrinas: definición, estructura y funciones biológicas

Los vipéridos comprenden las especies de serpientes más avanzadas evolutivamente, con un sistema de inyección del veneno a través de glifos móviles y especializados, similares a agujas hipodérmicas ¹. El veneno de esta familia se caracteriza principalmente por la presencia de metaloproteasas del veneno de serpiente (SVMPs por sus siglas en inglés). Estas enzimas son dependientes de Zn^{2+} y se conforman por varios dominios estructurales como, el dominio N-terminal, que se trata de un propéptido, el dominio metaloproteasa donde se encuentra el sitio de unión al catión Zn^{2+} , seguido del dominio desintegrina que posee secuencias específicas (RGD o KGD) que permite la unión a integrinas y finalmente un dominio C-terminal que es rico en cisteínas ^{2-4,6}.

La clasificación de las SVMP depende del número de dominios que la conformen: P-I a P-III ^{3,5,6}. Las PI consisten únicamente del dominio metaloproteasa, las PII presentan el dominio metaloproteasa junto con el dominio desintegrina en su extremo C-terminal. En cuanto a las PIII, además de los dominios metaloproteasa y desintegrina también contienen el dominio rico en cisteínas ⁶.

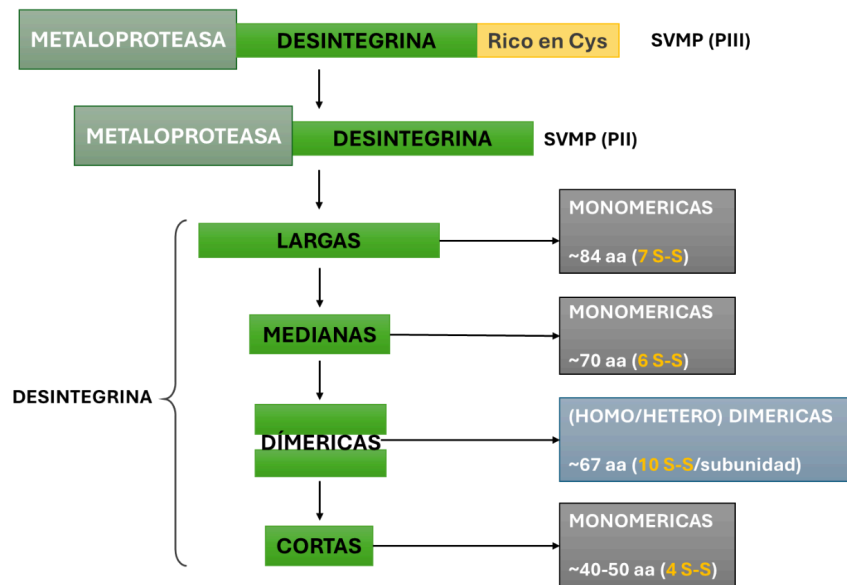
Las desintegrinas como tales, fueron descritas a finales de los años 80 como potentes inhibidores plaquetarios, a partir de la purificación de una pequeña proteína sin actividad enzimática del veneno de *Trimeresurus gramineus* ^{6,7}. Esta familia está compuesta por polipéptidos de entre 40 y 80 aminoácidos y presentan bajo peso molecular, rondando entre los 4 y los 16 kDa. No poseen actividad enzimática y su estructura está fuertemente

determinada por enlaces disulfuro, presentando un número variable de enlaces según su tamaño, lo que sirve como elemento clasificatorio ^{6,7}.

La clasificación dentro de la familia desintegrina depende principalmente de su estructura; si son monómeros o dímeros. Las monoméricas se subdividen en tres categorías en función del largo de su cadena aminoacídica (cortas, medianas o largas), mientras que las diméricas se subdividen en homodímeros o heterodiméricas (**Figura 1**) ^{6,7}. Las desintegrinas cortas rondan entre 40 y 49 aminoácidos y forman 4 enlaces disulfuro. Si se componen de ~70 residuos y 6 enlaces disulfuro, son desintegrinas medianas. En cuanto a las desintegrinas largas, estas constan de ~84 residuos aminoácidos y forman 7 enlaces disulfuro ^{6,7}. Por otro lado, las desintegrinas diméricas consisten en 2 subunidades de 67 aminoácidos y 10 enlaces disulfuro por cada subunidad, formando 4 enlaces intracatenarios y 2 intercatenarios, uniendo así ambas subunidades ^{6,7}. La diferencia entre las desintegrinas diméricas radica en si sus subunidades son iguales (homodiméricas) o diferentes (heterodiméricas) ^{6,7}. Las desintegrinas comparten una elevada tasa de similitud de secuencia, por lo que es una familia altamente homóloga, como se puede apreciar en la **Figura 2** ^{6,7}.

Estos polipéptidos se encuentran presentes en el veneno de varias familias de serpientes y pueden ser sintetizados por dos mecanismos diferentes; como el resultado del procesamiento proteolítico de las SVMPs de clase PII o sintetizadas a partir de ARNm cortos que carecen de la región codificante para metaloproteasa ⁶⁻⁸.

A)



B)

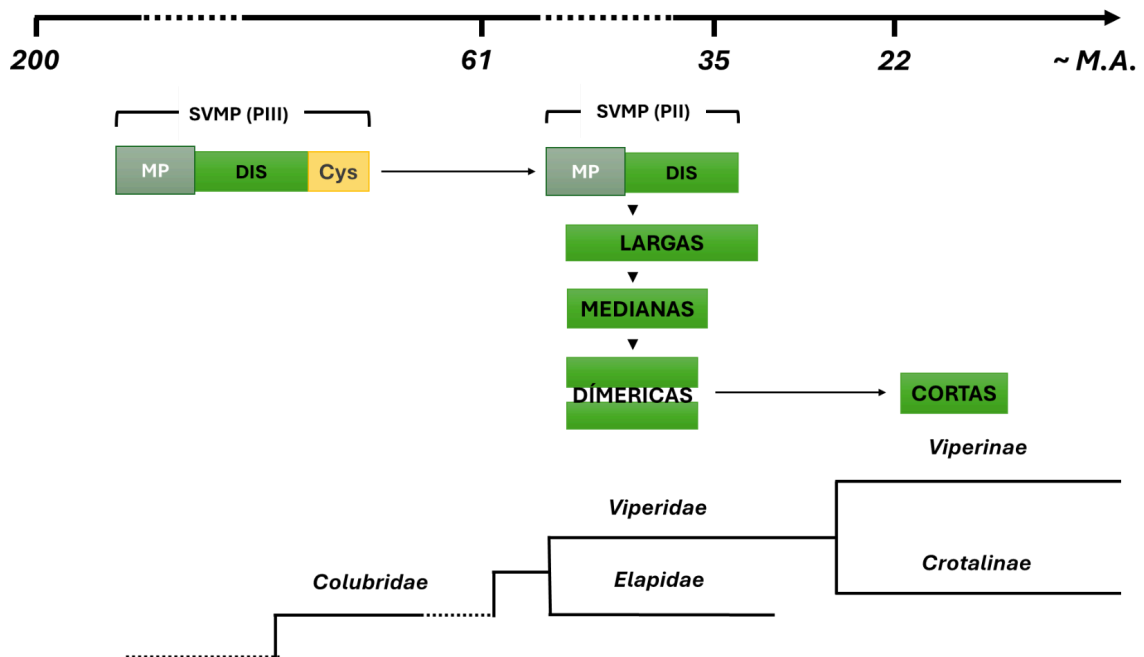


Figura 1: Representación de la clasificación y evolución de las desintegrinas. A) Clasificación estructural de las desintegrinas en función de su tamaño. **B)** Estas proteínas son el resultado de un proceso evolutivo de reorganización genética y estructural dado por la pérdida progresiva de intrones y enlaces disulfuro. El esquema ofrece una simplificación de un proceso evolutivo que ha tardado millones de años, dando lugar a las diferentes desintegrinas. Adaptado de Calvete *et al.*, 2009⁶ y Oliveira *et al.*, 2023⁷.

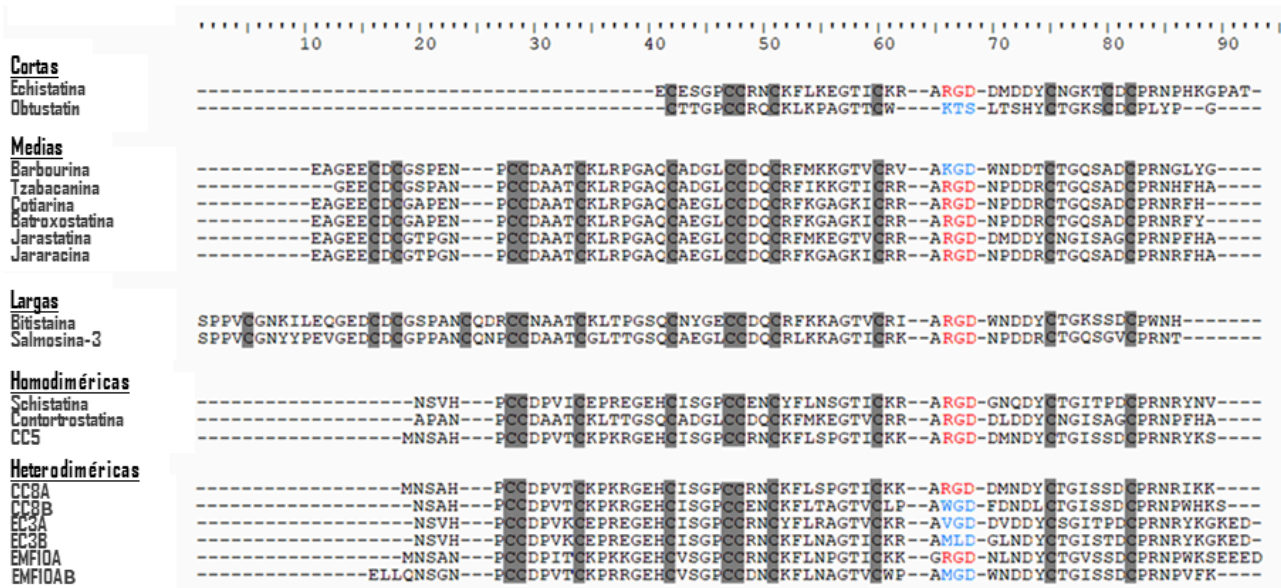


Figura 2. Alineamiento de desintegrinas de diferentes clases. Los tripéptidos que sirven de motivos de unión se indican con color: **rojo** (motivo RGD), **celeste** (motivos no-RGD). Los residuos de cisteína están resaltados en **gris**. Modificado de Oliveira *et al.*, 2023 ⁷.

Otra forma de clasificar a las desintegrinas es en función de sus motivos de unión a sus ligandos. Como su nombre sugiere, estas proteínas son antagonistas de las integrinas, una familia de glicoproteínas presentes en la superficie celular ^{6,7}.

A partir de los primeros análisis estructurales y bioquímicos realizados, se descubrió que su función está ligada a un motivo tripeptídico conformado por Arg-Gly-Asp (RGD) ubicado en un bucle móvil que se mantiene unido por medio de enlaces disulfuro ^{9,10}.

Sin embargo, el motivo RGD no es característico de las desintegrinas, pues no todas presentan este sitio de unión y dicho motivo también está presente en varios componentes de la matriz extracelular (MEC) como en el fibrinógeno, la fibronectina y la vitronectina ¹⁰. Existen otros motivos de unión entre las diferentes desintegrinas, además del RGD y que sirven como método de clasificación, entre los que se encuentran los siguientes: KGD, WGD, VGD, MGD, KTS y RTS (**Figura 3**) ^{6,7}. Estas diferencias en el motivo que sirve de sitio de unión implica la capacidad de reconocer diferentes ligandos entre ellas.

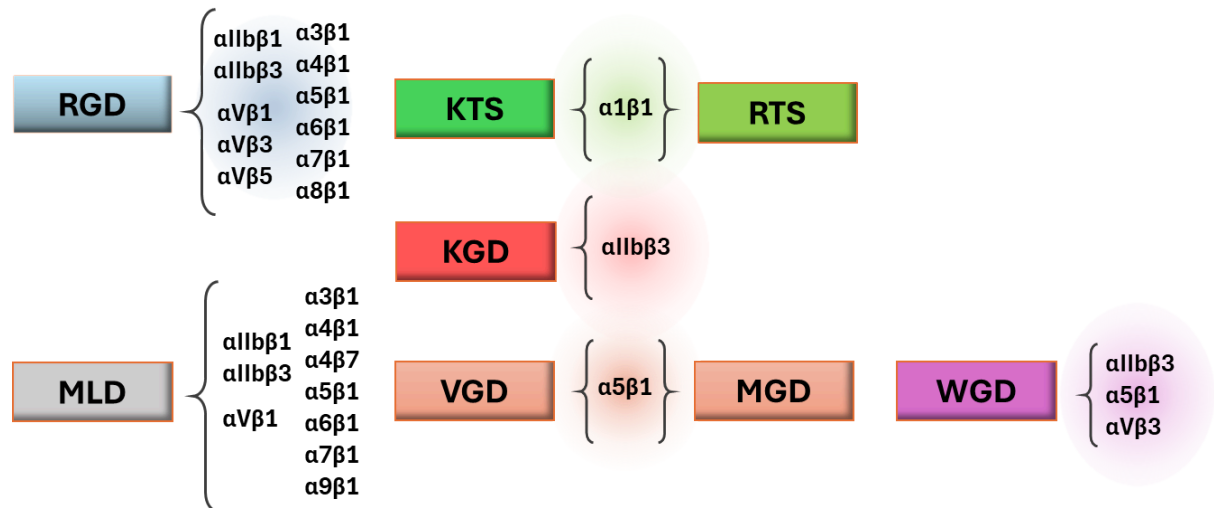


Figura 3: Motivos de unión de las desintegrinas. Se ejemplifican las integrinas que son reconocidas por los diferentes motivos de unión de la familia desintegrina: RGD, MLD, VGD, KDG, MGD, WGD, KTS y RTS, último motivo en ser identificado. Modificado de Oliveira *et al.*, 2023 ⁷.

Análisis estructurales llevados a cabo en la unión de la integrina $\alpha V\beta 3$ humana con un péptido sintético RGD, permitieron hipotetizar que las desintegrinas podrían actuar imitando el mecanismo de unión de los componentes de la MEC a los que se unen las integrinas ¹¹. Dado que varias integrinas comparten afinidad por los mismos ligandos, podría suponerse que todas aquellas desintegrinas que comparten una misma subunidad β , tienen al aspartato (D) como responsable de la interacción. Los otros dos residuos del motivo de unión tripeptídico (RG, KG, WG, VG, ML) serían los responsables de determinar la especificidad de unión con la subunidad α ¹². Esto no se aplicaría a los motivos de unión (R/K)TS.

Estudios realizados en otras desintegrinas revelaron que el sitio de reconocimiento funcional que interacciona con la integrina reside entre el bucle de unión y el extremo C-terminal. El movimiento coordinado de estos residuos adapta la estructura de la desintegrina mediante cambios conformacionales que determinan la afinidad y potencia de la unión a la integrina ^{10,13}.

Gracias a su especificidad de unión a las integrinas, las desintegrinas tienen un gran potencial para el desarrollo de herramientas moleculares, tales como su uso para el tratamiento de diversas patologías ^{7,15,16}. Desde la primera desintegrina descubierta, con sus propiedades antiagregantes a otras capaces de contrarrestar el crecimiento tumoral o la metástasis ^{7,14}. La principal razón de la versatilidad de posibles aplicaciones para las desintegrinas se debe al amplio abanico de funciones que cumplen las integrinas, como

desarrollaremos más adelante, pero entre ellas encontramos la unión a elementos de la MEC y uniones entre células ¹⁶. Por ejemplo, podemos encontrar las desintegrinas cortas con motivos de unión KTS (Lys-Thr-Ser) y RTS (Arg-Thr-Ser) ^{17,18}. De estructura monomérica, estas proteínas contienen 8 cisteínas, por lo que forman 4 enlaces disulfuro intramoleculares. Como se puede observar en la **Figura 3**, comparten su especificidad por la unión a la integrina $\alpha 1\beta 1$, bloqueando su interacción con el colágeno tipo I y IV de la membrana basal de la MEC ^{14,17,18}. Este tipo de desintegrinas cortas son sintetizadas a partir de ARNm cortos, en vez de ser producto del procesamiento proteolítico de SVMP tipo P-II, como otras desintegrinas ^{6,18}. La información de estos ARNm cortos codifica para tres dominios diferentes: un péptido inicial, ubicado en el extremo N-terminal, un propéptido y el dominio desintegrina ^{16,18}.

Estos ARNm podrían haber surgido por la eliminación y reorganización de enlaces disulfuro, a partir de la pérdida del dominio metaloproteasa de las SVMP tipo P-II ¹⁸.

Algunos ejemplos de desintegrinas con motivo KTS son obtustatina (*Macrovipera lebetina obtusa*), viperistatina (*Vipera palaestinae*) y lebestatina (*Daboia mauritanica*) ¹⁸. La única desintegrina con motivo RTS es la jerdostatina, objeto de estudio de esta tesis ¹⁸.

La especificidad, selectividad y potencia de unión de estas desintegrinas (R/K)TS a la integrina $\alpha 1\beta 1$, depende principalmente de la forma y tamaño del bucle de unión al ligando, determinado por la composición del tripéptido, en función de su secuencia, flexibilidad y orientación espacial. Este último aspecto se ha comparado con las desintegrinas con motivo RGD, revelando que las desintegrinas cortas (R/K)TS poseen su motivo de unión con una orientación espacial lateral, respecto a la ubicación del motivo RGD ^{13,17,18}.

Al compartir especificidad de blanco, las desintegrinas cortas con motivo KTS y RTS, son capaces de inhibir la angiogénesis y la progresión tumoral ^{6,17}. La obtustatina, por ejemplo, tiene probados efectos inhibitorios sobre la angiogénesis en modelos de membrana corioalantoidea (CAM), el crecimiento de células MV3 de melanoma humano en un modelo murino y la inhibición parcial del desarrollo de sarcoma en ratones ^{17,19,20}. La viperistatina, por su parte, bloquea parcialmente la adhesión y migración de células MV3 *in vitro*, pero es capaz de combatir la proliferación y el crecimiento tumoral *in vivo* ²¹. En cuanto a la leestatina es capaz de inhibir la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), además de bloquear la adhesión al colágeno I y IV y la migración de diversas líneas celulares, entre las que se encuentran las PC-12 y HUVEC ²².

1.1.3 Jerдостатина: una desintegrina corta RTS del veneno de serpiente

En el presente trabajo, nos enfocaremos en la jerdostatina. Se trata de una disintegrina corta formada por 43 aminoácidos y cuya estructura se sostiene por la formación de cuatro enlaces disulfuro intramoleculares ¹⁸. Su principal característica es que su motivo de unión al ligando está conformado por el tripéptido Arg-Thr-Ser (RTS) ¹⁸. Como se indicó anteriormente, al igual que las desintegrinas cortas KTS, se une de forma específica a la integrina $\alpha 1\beta 1$ ^{17,18}. La jerdostatina fue sintetizada a partir de una librería de ADNc de la glándula del veneno de *Protobothrops jerdonii* por Sanz *et al.* (2005), donde se describió su secuencia nucleotídica y aminoacídica (**Figura 4**)¹⁸. Si bien la jerdostatina no se detectó en el veneno de *P. jerdonii*, se ha encontrado su presencia en el veneno de otra especie, *Daboia russelli* y homólogos RTS en el transcriptoma de la especie *Daboia simensis* ^{18,23,8}.

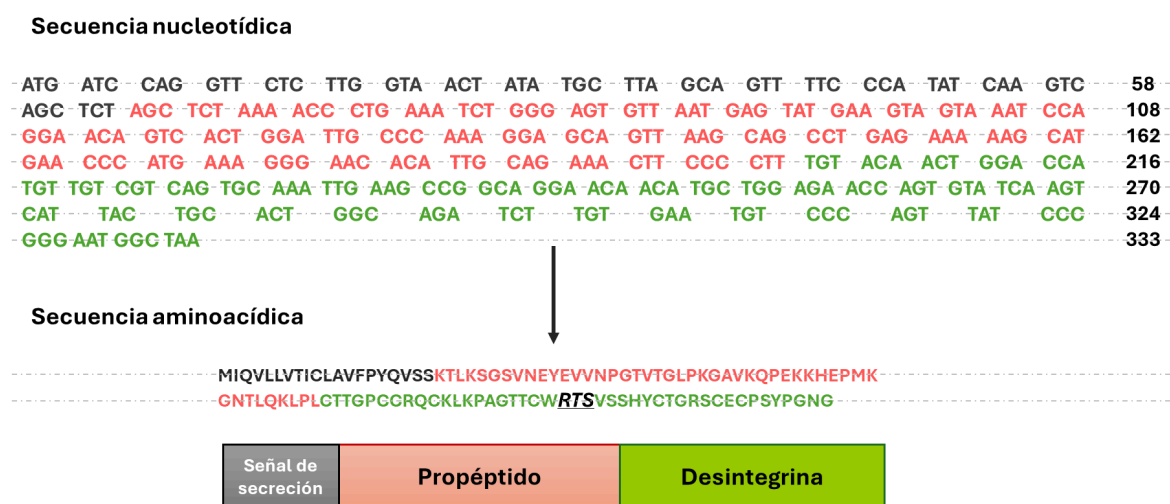


Figura 4: Secuencia nucleotídica y aminoacídica de la jerdostatina. El ARNm corto que codifica para la desintegrina consta de tres dominios. Los primeros 20 residuos corresponden a una señal de secreción (gris), necesaria para la exocitosis de la proteína madura luego de su procesado en el retículo endoplasmático. Los siguientes 47 aminoácidos son del propéptido (rosado) y finalmente el dominio desintegrina, que consta de 43 aminoácidos (verde). Subrayado en negro se indica el motivo de unión RTS. Modificado de Sanz *et al.*, 2005 ¹⁸.

Previamente se mencionó que las desintegrinas son proteínas con una elevada homología ^{6,7}. La jerdostatina no es la excepción; posee entre un 80 y 85% de similitud de secuencia con las desintegrinas cortas KTS, como obtustatina, vipirestatina y lebestatina, desintegrinas con las que comparte ligando específico ¹⁸. Las principales diferencias están en los residuos del bucle de reconocimiento y en el extremo C-terminal; mientras que las

desintegrinas cortas KTS sufren la escisión post-traducciona de dos residuos (NG) en sus colas C-terminales, jerdostatina conserva ambos, como se ilustra en la **Figura 5**¹⁸.

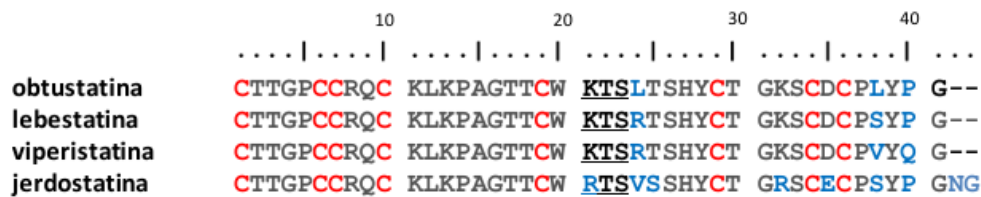


Figura 5: Alineamiento de las secuencias de desintegrinas cortas (R/K)TS. Se compara la secuencia de aminoácidos de las desintegrinas cortas con motivos KTS (obtustatina, lebestatina, viperistatina) con la jerdostatina, que posee un motivo de unión RTS. Los motivos de unión se señalan en negro, subrayado. En rojo se resaltan las cisteínas y finalmente en celeste se indican los aminoácidos que se diferencian entre las secuencias, incluyendo el extremo C-terminal adicional de jerdostatina. Modificado de Sanz *et al.*, 2005¹⁸.

Al igual que las integrinas cortas KTS, jerdostatina se une de forma específica a la integrina $\alpha 1\beta 1$, bloqueando la unión de esta al colágeno. Al probarse sus efectos con otras integrinas como $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha 11\beta 3$ y $\alpha v\beta 3$, no se observó actividad inhibitoria, según lo reportado por Sanz *et al.* (2005)¹⁸.

Al compararse su capacidad de bloquear la interacción con la integrina, respecto a las desintegrinas cortas KTS, se vió que es menos activa. A su vez, Sanz *et al.* (2005)¹⁸ creó un mutante sustituyendo la Arg (R) del motivo de unión por una Lys (K), revelando que el mutante es menos activo que la forma wild-type¹⁸. Esto podría deberse a que la presencia de Arg le otorga a la jerdostatina una mayor flexibilidad en su bucle móvil de unión, favoreciendo su interacción con el ligando (**Figura 6**)^{18,13}.

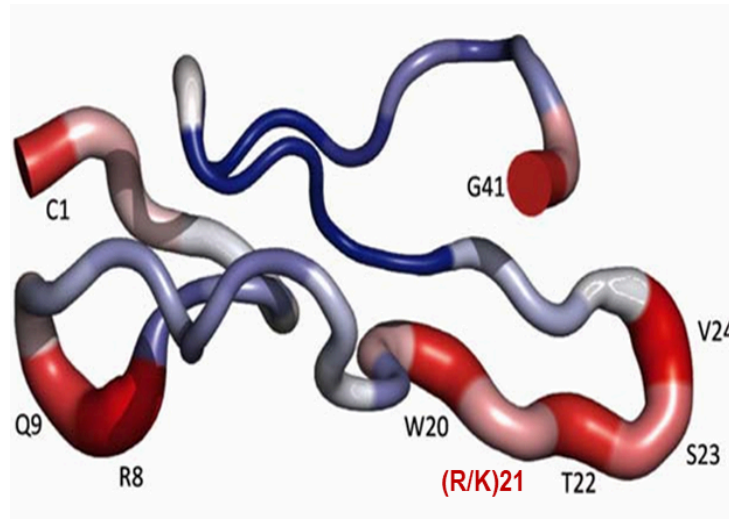


Figura 6: Representación de la superposición de las estructuras promedio de jerdostatina. Para la generación de esta representación, se superpusieron las estructuras promedio generadas por Resonancia magnética nuclear (NMR) de cuatro formas diferentes de jerdostatina en función de sus conformaciones más estables en solución; la conformación nativa con motivo RTS (rJerR21), jerdostatina RTS sin los residuos NG de su cola C-terminal (rJer21 Δ NG), jerdostatina mutante con un motivo KTS (rJerK21) y jerdostatina mutante KTS, sin los residuos NG de su cola C-terminal (rJerK21 Δ NG). El motivo de unión de la superposición, es el resultado de los motivos RTS y KTS, siendo los aminoácidos en las posiciones 21, 22 y 23. En texto rojo se señala el aminoácido mutado. Las regiones rojas y más gruesas indican una mayor dispersión, asociada a una mayor flexibilidad en la molécula, siendo las regiones más estrechas y en azul, las que presentan una mayor rigidez estructural. Adaptado de Carbajo *et al.*, 2011 ¹³.

Ensayos realizados por Bolás *et al.*, (2014) ²⁴ para evaluar el uso de jerdostatina como una posible estrategia antiangiogénica, revelaron que la desintegrina no interactúa con el dominio α -I aislado de la subunidad α 1, el cual es el sitio de unión del colágeno ²⁴. Sin embargo, comprobaron que jerdostatina es capaz de inhibir la adhesión de células de músculo liso de aorta de rata al fragmento CB3, de forma dosis dependiente ²⁴. Adicionalmente, también se comprobó su capacidad de inhibir (de manera dosis dependiente) la formación de túbulos en células HUVEC, revelando su potencial antiangiogénico ²⁴.

La información hasta ahora mencionada fue recabada con jerdostatina producida en *E. coli*, pero también se ha expresado en células eucariotas, como las HEK-293, transformadas de forma transitoria ^{18,24,25}. La desintegrina producida en este sistema fue capaz de inhibir la unión de la integrina α 1 β 1 al fragmento CB3 del colágeno IV, además de bloquear la adhesión de células RuGli al colágeno IV ²⁵.

A pesar de que la jerdostatina se ha estudiado en modelos de angiogénesis o en líneas tumorales, no se dispone de información sobre el efecto que esta pueda causar sobre células del sistema inmune.

1.2 La superfamilia de las integrinas

Como mencionamos anteriormente, las desintegrinas reciben su nombre directamente de su blanco molecular y su función: bloquear la unión de las integrinas a su ligando.

Las integrinas comprenden una superfamilia de glicoproteínas transmembrana que actúan fundamentalmente mediando la adhesión celular en interacciones célula-célula y célula-MEC ^{26,27}. Reconocen diversos componentes de la MEC, como el colágeno, la fibronectina y la laminina, además de otras moléculas de adhesión que se expresan en la superficie celular, como las moléculas de adhesión intercelular (ICAM) o incluso proteína plasmáticas, como el factor de von Willebrand o el fibrinógeno ^{26,27}.

Estructuralmente, son heterodímeros formados por dos subunidades; una subunidad α y una subunidad β , que se encuentran unidos por enlaces no covalentes, existiendo en el humano 24 integrinas diferentes, formadas por una combinación entre una de las 18 subunidades α y una de las 8 subunidades β , generando un diverso repertorio de ligandos (**Figura 7**)²⁸. La función específica y patrón de expresión de las diferentes integrinas varía entre los distintos tejidos²⁸.

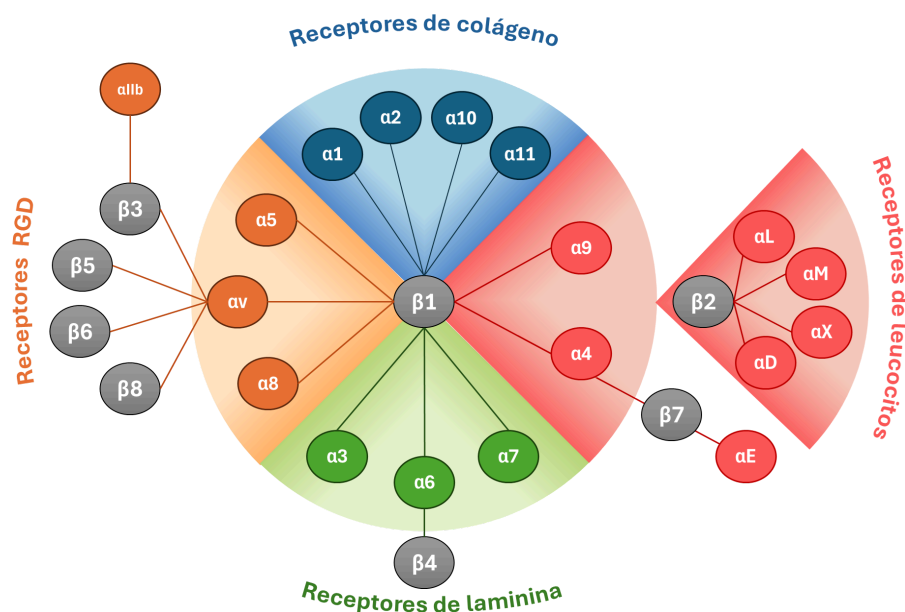


Figura 7: Familias de integrinas y sus ligandos. Representación de las 24 posibles combinaciones que pueden ocurrir en la formación de los heterodímeros de las integrinas. En el círculo central se ubica la subunidad $\beta 1$, capaz de unirse a 12 diferentes subunidades α . Cada color representa los ligandos posibles para las subunidades correspondientes. Adaptado de Péter *et al.*, 2021 ²⁸.

En general, las subunidades α consisten en cuatro o 5 dominios extracelulares; un dominio α -I (“inserted”, solo presente en la mitad de las subunidades α), el dominio β -propeller, un dominio *thigh* y dos dominios *calf*. Dentro de la secuencia del dominio β -propeller existen sitios de unión a Ca^{2+} que son necesarios para la unión de ligando ²⁶⁻²⁸. La porción extracelular de la subunidad β está conformada por siete dominios flexibles. El dominio β -I forma parte del dominio *hybrid*, que está insertado en el dominio *PSI* (*plexin-semaphorin-integrin*). Además hay cuatro dominios *EGF* (*Epidermal growth factor*) y finalmente el dominio β -tail, que une con la porción transmembrana (**Figura 8**) ²⁶⁻²⁸.

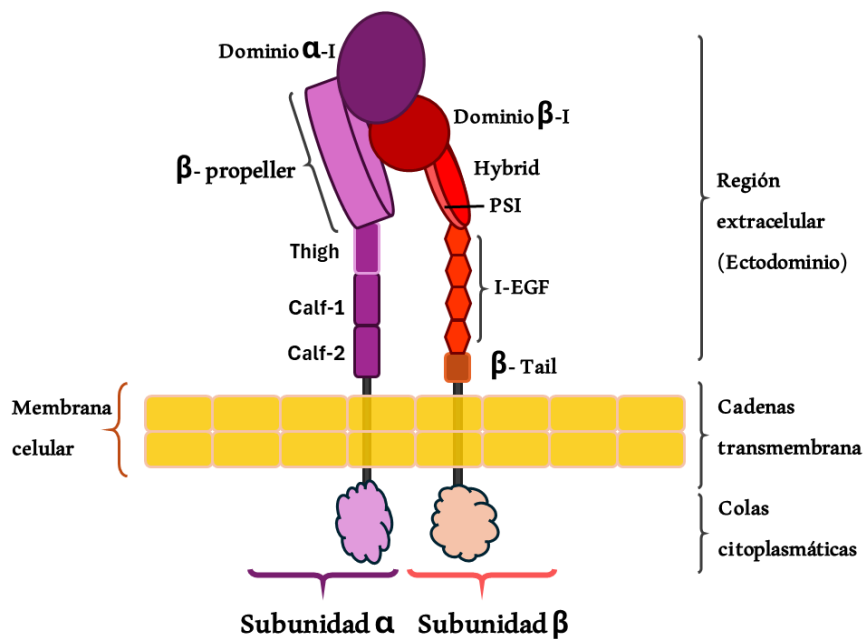


Figura 8: Estructura de las integrinas. Las dos subunidades que forman cada integrina constan de tres regiones (extracelular, transmembrana y citoplasmática), que a su vez se dividen en varios dominios con distintas funciones. Modificado de Nevo (2010) ²⁹.

Al tratarse de proteínas transmembrana, cada una de las subunidades posee dominios extracelulares (o ectodominio), una cadena transmembrana de un solo paso, que las ancla a la superficie celular y una cola citoplasmática corta no estructurada (**Figura 8**) ^{29,30}.

La versatilidad funcional de las integrinas reside, además, en su capacidad de unión alostérica que da lugar a tres conformaciones distintas: cerrada plegada, cerrada extendida y activa extendida. Estas conformaciones determinan la afinidad de las integrinas por su ligando, como se ilustra en la **Figura 9** ²⁶⁻³⁰.

En su estado inactivo, el ectodominio se encuentra plegado sobre sí mismo, limitando el acceso al sitio de unión al ligando. Sin embargo, mediante un proceso denominado

señalización “inside-out”, la unión de proteínas adaptadoras a la cola citoplasmática de la subunidad β provoca una extensión del ectodominio, separando las subunidades y activando el sitio de unión dependiente de cationes metálicos, el dominio MIDAS (metal-ion-dependent adhesion site). La presencia de este dominio permite la unión de cationes metálicos divalentes, imprescindibles para la interacción con el ligando, permitiendo la señalización “outside-in” al interactuar con componentes extracelulares ^{27,29,30}. De esta forma, las integrinas tienen una capacidad bidireccional de señalización; una que proviene del interior de la célula y otra del exterior ^{27,29,30}.

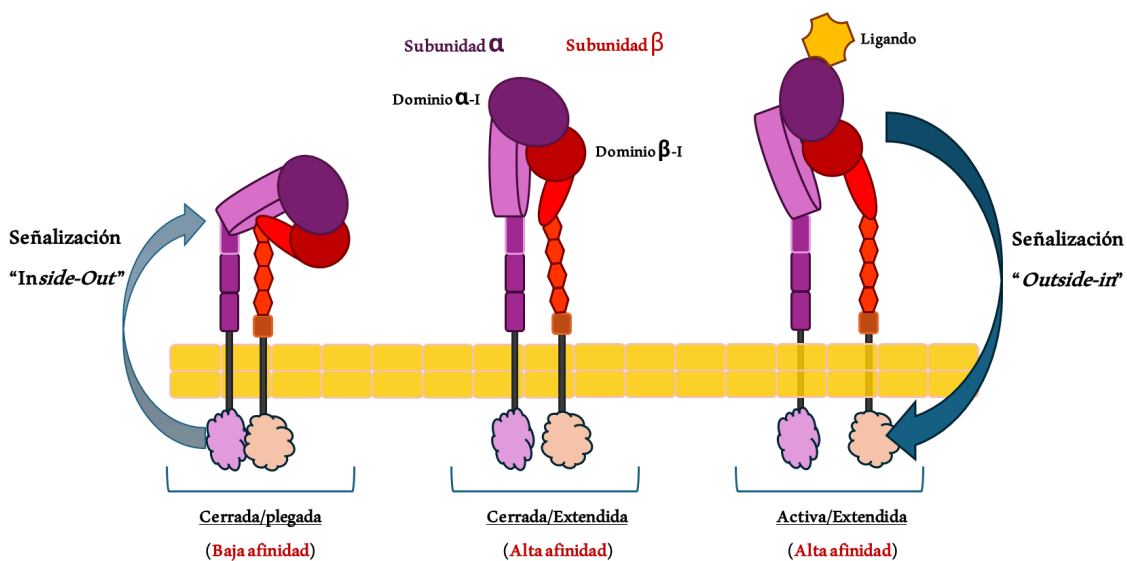


Figura 9: Conformaciones posibles que adoptan las integrinas. Los estados conformacionales de las integrinas regulan su afinidad por los ligandos, permitiendo la señalización bidireccional desde el interior celular hacia el exterior (“*Inside-Out*”) o desde el exterior celular hacia el interior (“*Outside-In*”). Modificado de Yu *et al.*, 2023 ³⁰.

Las integrinas actúan como mecanotransductores, donde integran los estímulos mecánicos del entorno activando cascadas de señalización. Si bien su ectodominio contacta con los componentes de la MEC, otras moléculas de superficie o factores solubles, los dominios citoplasmáticos contactan con proteínas adaptadoras y/o estructurales, que permiten interactuar con el citoesqueleto ^{30,31}. En la interfaz célula-MEC, coordinan la formación de complejos de adhesión focal, donde la vinculina y la quinasa de adhesión focal (FAK) disparan rutas de supervivencia y proliferación ^{31,32}. Por su parte, la interacción célula-célula mediada por integrinas es fundamental para el desarrollo de procesos como la hemostasia y el tráfico leucocitario. En este último aspecto, estos receptores permiten que los leucocitos migren, se adhieran firmemente a células endoteliales, dando lugar a la diapédesis, favoreciendo la respuesta inflamatoria tisular ^{28,33,34}.

Las integrinas pertenecientes a la familia $\beta 2$ son propias del linaje hematopoyético y fundamentales para sus roles en el sistema inmune. Allí se pueden encontrar algunos ejemplos como la integrina $\alpha L\beta 2$ (o LFA-1), que actúa como mediador de la adhesión célula-célula, permitiendo la unión al endotelio vascular a través de la interacción con ligandos ICAM ^{27,33,34}. Esta molécula es fundamental para la sinapsis inmunológica, permitiendo la activación de linfocitos T (LT) por parte de las células presentadoras de antígenos (APC) ³⁵. La integrina $\alpha x\beta 2$ (CD11c), característico de las células dendríticas (DC) que permite la fagocitosis de bacterias, pero también la adhesión al fibrinógeno, indispensable para que las DC y otras APC (como los macrófagos y monocitos), capturen y presenten patógenos en los ganglios linfáticos ³⁶. Citando otro ejemplo, la integrina $\alpha M\beta 2$ (CD11b), que se expresa principalmente en leucocitos de la línea mieloide (como los neutrófilos y macrófagos) colabora en la fagocitosis de patógenos opsonizados ³⁷.

Por otro lado, se pueden citar como ejemplo a las integrinas de la familia $\beta 1$, también conocidas como VLA (*very late antigen*), proteínas que no se expresan de forma constitutiva, de ahí su nombre ^{38,39}. Permiten la migración de células inmunes luego de que se extravasan del torrente sanguíneo ³⁸. Estas integrinas median la unión a proteínas de la familia de las VCAM (moléculas de adhesión celular vascular), mediando el reclutamiento de linfocitos y monocitos a los tejidos inflamados ³⁸. Dentro de esta familia se encuentra la **integrina $\alpha 1\beta 1$** , también conocida como VLA-1 ^{38,39}. Se trata de una proteína con un papel relevante en la regulación del microambiente tisular, participando en la regulación de la composición de la matriz extracelular en tejidos inflamados o en reparación ⁴⁰. Regula también la diferenciación celular al modular la tensión mecánica interna, influyendo directamente en la capacidad de la célula para migrar a través de la MEC. Sus principales ligandos el son colágeno de tipo I y IV, aunque tiene una marcada preferencia por el colágeno IV ^{38,40,41}. Este, es el principal componente de la membrana basal, la capa de la MEC que sirve de sustrato para las células, ofreciéndoles puntos de anclaje, permitiendo además de la adhesión, que migren y proliferen, influyendo directamente sobre la fisiología celular ³⁸. El colágeno IV se compone de seis cadenas polipeptídicas que constan de tres dominios; el dominio N-terminal, una triple hélice helicoidal y el dominio C-terminal globular no colagenoso (NC1) ⁴². Próximo a este dominio se encuentra el fragmento derivado del bromuro de cianógeno (CB3), donde la triple hélice se encuentra estabilizada por puentes disulfuro intercatenarios ⁴². Este fragmento permite la interacción con la integrina $\alpha 1\beta 1$, donde el motivo MIDAS que se encuentra en el dominio α -I de la integrina, cambia la coordinación de su catión metálico, generando cambios conformacionales en la integrina que aumentan su afinidad por el ligando y activando la señalización intracelular “outside-in”

^{27,29,42}.

Además de su función en la adhesión, la integrina $\alpha 1\beta 1$ posee un rol muy importante en el proceso de angiogénesis, facilitando la migración de las células endoteliales sobre el colágeno ^{34,41,43}. Este proceso es fundamental durante la formación de nuevos vasos sanguíneos, ya que al unirse al colágeno IV de la membrana basal, la integrina $\alpha 1\beta 1$ contribuye a la estabilidad y desarrollo de los vasos recién formados ^{34,41,43}. Además, factores pro-angiogénicos como el VEGF, potencian la expresión y señalización de esta integrina, reafirmando su relevancia en este proceso ^{34,41,43}.

La integrina $\alpha 1\beta 1$ se expresa principalmente en células del mesénquima y endoteliales, pero también en varios tipos de leucocitos, como los monocitos, macrófagos o LT ^{43,44}. Particularmente, en los LT se expresa tras su activación y su expresión permanece elevada en los LT de memoria, facilitando su migración hacia los tejidos inflamados, o su retención en órganos no linfoides ⁴⁵.

1.3 Células dendríticas: características y funciones

El sistema inmune se compone de un conjunto de células, proteínas y órganos, que suele dividirse en dos: innato y adaptativo ⁴⁶. El primero, conservado evolutivamente, incluye la piel, como una barrera protectora que limita y protege al organismo, pero también incluye células y diversas proteínas plasmáticas, como las del complemento. Por otro lado, el sistema inmune adaptativo es capaz de generar respuestas específicas contra patógenos a través del desarrollo de respuestas inmunes celulares y humorales ⁴⁶. De esta forma, el sistema inmune es uno de los sistemas de organización celular más intrincados del organismo, debido a su compleja función, entre las que se encuentran; reconocer patógenos, moléculas extrañas, células y tejidos dañados y también se encarga del mantenimiento de la tolerancia, para proteger los tejidos sanos ⁴⁶.

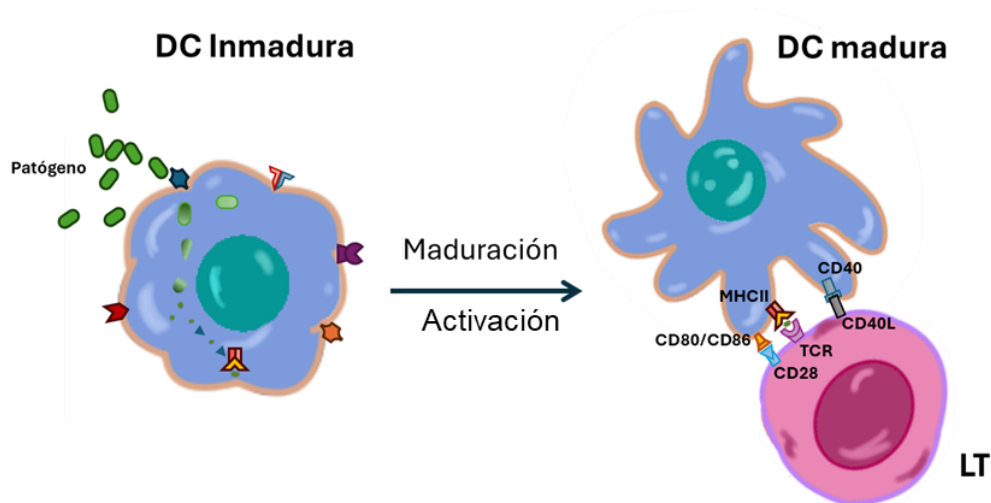
Las DC se distribuyen por todo el organismo, generando una compleja red que permite la comunicación con diferentes poblaciones celulares, por ejemplo, los LT, promoviendo así una conexión entre el ambiente exterior y el sistema inmune adaptativo ⁴⁶. De esta forma, constituyen el nexo entre la inmunidad innata y la adaptativa. En su estado inmaduro, actúan como centinelas residentes en los tejidos, sensando constantemente el medio extracelular a través de mecanismos como la endocitosis, fagocitosis y macropinocitosis ⁴⁶. Son las APC por excelencia, siendo las más potentes y las únicas capaces de activar LT vírgenes ^{46,47}. Las DC no solo se encargan de dirigir la respuesta inmune, sino que también son las responsables de mediar la tolerancia, jugando un rol clave en infecciones y enfermedades autoinmunes ⁴⁶⁻⁴⁸.

La principal función de las DC como células residentes de los tejidos es sensar continuamente el microambiente, en búsqueda de patógenos o daño celular y tisular. La activación de las DC comienza a partir de la detección de señales de peligro a través de sus receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), capaces del reconocimiento de PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) y DAMPs (patrones moleculares asociados al daño) ^{46,49,50}. En este punto, la DC inmadura expresa diversos receptores fagocíticos y endocíticos que le permiten reconocer estas señales de daño; como receptores tipo Toll (TLR), receptores de lectina tipo C (CLR), así como receptores Fc o *scavenger* ^{48,50,51}. La cascada de señalización consecuente a la activación de estos receptores provoca cambios morfológicos y funcionales en la DC. Ejemplo de esto son su reprogramación fenotípica, morfológica y funcional donde disminuye su elevada tasa de captura de antígenos, para potenciar su capacidad de presentarlos en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Conjuntamente, se expresan diversas moléculas en la superficie de la DC que contribuyen a sus funciones como célula

presentadora de antígenos, tales como las moléculas de co-estimulación como CD40, CD80 y CD86, las cuales proporcionan señales necesarias para promover la correcta activación de los LT durante la sinapsis inmunológica ^{47,52}.

Para que ocurra el contacto entre las DC y los LT, es necesario que las primeras expresen el receptor de quimioquinas CCR7, permitiendo su migración hacia los tejidos linfoides (ganglios linfáticos o el bazo) donde residen los LT, guiados por las quimioquinas CCL19 y CCL21 ^{47,52}. La **Figura 10**, resume de forma esquemática el proceso de maduración y activación de las DC y como es su interacción con los LT ⁵².

Además de la expresión de moléculas en su superficie, la activación de DC induce la producción y secreción de citoquinas ^{47,53}. Estas proteínas actúan como mensajeros celulares del sistema inmunológico, desencadenando diversos procesos que resultan en la inflamación (o su resolución) y la reparación del tejido ^{52,53}. Las citoquinas secretadas y su efecto quedarán determinados por el contexto inmunológico en el que ocurre su expresión ^{52,53}.



	Inmadura	Madura
Ubicación	Tejidos periféricos (Centinelas)	Órganos linfoides secundarios
Endocitosis	Elevada	Baja
Procesamiento de Antígenos	Elevada	Baja
Presentación de Antígenos	Baja	Elevada
Expresión de moléculas de coestimulación y MHC	Baja	Elevada

Figura 10: Diferencias entre los estados inmaduro y maduro de las DC. Las células DC inmaduras son células centinelas, residentes de los tejidos que censan constantemente el medio que las rodea. Al detectar una señal de peligro, maduran y se activan, dejando de censar el medio y expresando moléculas de superficie que le servirán para activar a LT vírgenes en los ganglios. Modificado de Thaiss *et al.*, 2011 ⁵².

Dentro de los diversos receptores presentes en las DC (y otras células del sistema inmune), los receptores tipo toll (TLR) son los más estudiados debido a su importancia funcional ^{54,55}. Existen distintos TLR que reconocen diferentes moléculas en función a su naturaleza, lo que está relacionado con la ubicación del receptor en la propia célula. Por ejemplo, los TLR anclados a la membrana celular, tienen por ligandos a moléculas ubicadas normalmente en la superficie de patógenos extracelulares, como TLR4, que reconoce lipopolisacáridos (LPS), o TLR2 que forma dímeros (TLR2/2, TLR1/2, TLR2/6) que reconocen diferentes componentes de la pared celular de microorganismos; lipoproteínas triaciladas (TLR1/2) o lipoproteínas diaciladas (TLR2/6) ^{55,56}. Por otro lado, los TLR endosomales (ubicados en el interior de la célula), reconocen motivos de ácidos nucleicos de patógenos. El ARN doble hebra es agonista de TLR3, así como TLR9 detecta ADN con secuencias CpG sin metilar, características del ADN viral y bacteriano ^{55,56}. En la **Tabla 1** se incluyen algunos ejemplos más.

Tabla 1: Ubicación y ligandos de los diferentes tipos de TLR.

Receptor	Ubicación	Ligando
TLR1/2	Membrana celular	Peptidoglicanos, lipopéptidos, lipopéptidos, ácido lipoteicoico, β -glucanos, mananos
TLR2/6	Membrana celular	Lipopéptidos
TLR3	Endosomal	ARN viral doble hebra
TLR4	Membrana celular	Lipopolisacáridos, mananos, glicofosfolípidos de inositol, algunas proteínas de fusión virales
TLR5	Membrana celular	Flagelina
TLR7/8	Endosomal	ARN viral monocatenario
TLR9	Endosomal	ADN CpG

Adaptado de Hernández, J. C. *et al.*, 2007⁵⁶.

Cuando los TLR se unen a su ligando, se dispara una cascada de señalización intracelular que involucra a otras proteínas adaptadoras, como lo son MyD88 o TRIF, según qué TLR se active concretamente⁵⁵. El resultado final de estas cascadas de señalización es la activación de factores de transcripción, como el factor nuclear κ B (NF- κ B), la proteína activadora 1 (AP-1) y los Factores reguladores de Interferón (IRF), que inducen la transcripción de genes necesarios para la presentación de antígenos, como las proteínas mencionadas (MHC, co-estimuladoras y las citoquinas, como la interleuquina-1 (IL-1) o la interleuquina-6 (IL-6)) (**Figura 11**)^{55,57}.

La naturaleza del patógeno y el PRR que se active al reconocerlo determinarán el repertorio de citoquinas producidas por esta señal⁵². Siguiendo con los TLR como ejemplo; TLR4 y TLR8 inducen la expresión de la interleuquina IL-12 (IL-12). Esta citoquina producida por las DC, promueve la polarización de los LT CD4⁺ vírgenes en el fenotipo Th1 (linfocito T colaborador 1) al estimular el factor de transcripción T-bet, que a su vez induce la producción del Interferón- γ (IFN γ). Los LT CD4 con el fenotipo Th1 son promovidos por la presencia de patógenos intracelulares. Se caracterizan por la secreción de IFN- γ , que

estimula la diferenciación de LT CD8⁺ a LT citotóxicos y la activación de los macrófagos, potenciando sus capacidades fagocíticas ^{52,57}.

Existen otros subtipos de linfocitos Th, como el perfil Th2, que es promovido por la presencia de IL-4 y antagoniza con la polarización a Th1. Los factores de transcripción claves en este perfil, son GATA3 y STAT6, que dan lugar a una población de LT colaboradores dirigida a combatir patógenos extracelulares ^{52,57}.

Algunos patógenos extracelulares de origen bacteriano o fúngico, inducen la secreción de IL-6, que al actuar en conjunto con el factor de crecimiento transformante-β (TGF-β), favorecen la polarización de los LT CD4⁺ vírgenes al fenotipo Th17. Esta combinación de citoquinas activan el factor de transcripción RORγt, imprescindible para la diferenciación hacia este fenotipo ^{52,57,58}.

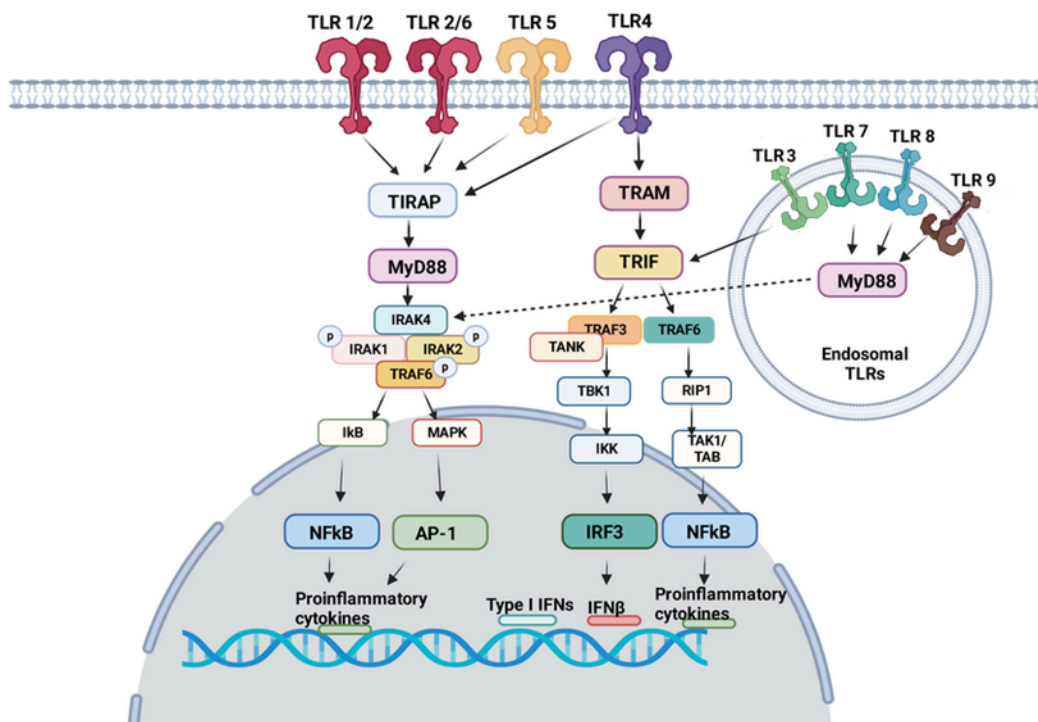


Figura 11: Vías de señalización de los diferentes TLR. Los diferentes TLR reconocen distintos patrones moleculares pero sus vías de señalización convergen en la interacción mediada por MYD88 o TRIF. Independientemente de las proteínas adaptadoras involucradas, la estimulación de cualquiera de los TLR resulta en la activación de factores de transcripción y la secreción de citoquinas. Extraído de Alhamdan *et al.*, (2024) ⁵⁵.

Por último, los LT reguladores (Treg), adoptan este fenotipo gracias a la expresión del factor de transcripción FoxP3, estimulado por las citoquinas IL-10 y TGF-β. Este subtipo de LT

CD4 contribuye a la resolución de la inflamación y a la generación de la tolerancia, secretando principalmente IL-10 y TGF- β (las mismas citoquinas responsables de su diferenciación) y otros mecanismos de inmunosupresión ^{52,57}.

En resumen, el proceso de polarización de la respuesta celular T depende de la sumatoria de múltiples señales determinadas por el patógeno y los PRRs que activan, el contexto del microambiente donde se desarrolla la respuesta inmune y la maduración de la DC en función a estos factores. Este conjunto de sucesos decidirá si se dispara una respuesta inmunogénica o tolerogénica ⁵².

1.3.1 Expresión de integrinas por DC

Las DCs expresan diversas integrinas, especialmente de la familia $\beta 2$ y algunas $\beta 1$, que les permiten la interacción con componentes de la MEC o con moléculas de superficie en otras células.⁵⁹ Esta expresión no es constante, pues varía en función de su estado de madurez o activación y como se mencionó anteriormente, estos receptores son capaces de modular diversos procesos, algo que también influye en el fenotipo de la DC ^{(60),61}.

Las integrinas de la familia $\beta 2$ se expresan de forma constitutiva en las DC, donde favorecen su adhesión al sustrato, limitando la expresión basal de moléculas coestimuladoras y citoquinas proinflamatorias, manteniendo un estado inmaduro que evite su activación ⁶². Algunos estudios han demostrado que la ruptura de la adhesión mediada por integrinas $\beta 2$ (por alteración genética o por bloqueo funcional), promueve cambios epigenéticos y transcripcionales como el aumento en la expresión de CD86, CCR7 e IL-12, que inducen la maduración espontánea de las DC sin la necesidad de fuertes estímulos inflamatorios ⁶³. En consecuencia, la adhesión mediada por integrinas $\beta 2$ actúa como un mecanismo regulador que limita la activación de las DC y su capacidad inmunoestimuladora. ^{62,63}.

La integrina $\alpha 4\beta 1$, cuya subunidad α es el marcador CD49d, se ve estimulada por la estimulación de LPS o TNF- α , favoreciendo la adhesión a la fibronectina y otros componentes de la MEC, permitiendo la migración de las DC hacia los ganglios linfáticos ⁶⁰. Además, se ha observado que, en modelos de encefalomiелitis autoinmune, esta integrina media el reclutamiento de DC inmaduras a través de la barrera hematoencefálica ⁶¹.

Por otro lado, se ha encontrado un fenotipo específico de DC (CD11c^{high}, CD40^{high}, CD8 α ^{int}) en ganglios linfáticos periféricos que expresan integrina la $\alpha 1\beta 1$ y la integrina $\alpha E\beta 7$. Esto les permite una interacción más estable con linfocitos T y les otorga una mejor capacidad de

adhesión y captura de antígenos respecto a las que DC que no expresan la integrina $\alpha 1\beta 1$

⁶⁴.

Debido al rol que las integrinas pueden desempeñar a nivel del sistema inmune, se puede inferir que las desintegrinas son capaces de contrarrestar los efectos mediados por dichas proteínas. A modo de ejemplo, estudios realizados en un modelo de sepsis inducida por infección bacteriana demostraron que la desintegrina rhodostomina (antagonista de la integrina $\alpha V\beta 3$) suprime la inflamación mediada por TLR2/4, reduciendo la endotoxemia producida por LPS ⁶⁵. Además inhibe la adhesión, migración y liberación de citoquinas por parte de células THP-1 estimuladas con Pam3CSK4, ligando de TLR2 ⁶⁵.

Más allá de las desintegrinas, existe diversa evidencia de que el veneno de las serpientes es capaz de afectar la respuesta inmune, por ejemplo, promoviendo un cuadro pro-inflamatorio, estimulando la secreción de IL-1 β , IL-6, TNF- α , INF- γ , así como de las producciones de las anafilotoxinas del complemento, C3a y C5a. De esta forma, es normal que se activen los diferentes fagocitos por el cuadro generado ^{66,67,68}.

Al mismo tiempo, se han observado toxinas capaces de estimular la producción de moléculas pro-resolutivas, como la IL-10 o mediadores lipídicos como la 5-deoxy- $\Delta 12,14$ -prostaglandina J₂ ^{69,70,71,72}. A pesar de estas evidencias, no existen reportes sobre el efecto de la jerdostatina sobre las DCs.

El amplio repertorio de moléculas bioactivas presentes en los venenos de serpientes puede afectar varios niveles de la respuesta inmune, actuando como potenciadores de un cuadro inflamatorio o estimulando la producción de moléculas que resuelven la inflamación, promoviendo la homeostasis ⁶⁹⁻⁷². Esta riqueza molecular que los caracteriza, ofrece un amplio abanico de posibles usos biotecnológicos para sus componentes, ya sea la producción recombinante, síntesis de análogos o moléculas derivadas, como algunos de los ejemplos ya mencionados en esta introducción ^{5,11,17}.

1.4 Producción recombinante de proteínas de veneno: desafíos y estrategias

A pesar de que históricamente las proteínas del veneno de serpiente se han purificado a partir del veneno, la producción recombinante de sus componentes puede ofrecer diversas ventajas, ganando terreno como una alternativa sostenible.

Partiendo de un punto de vista ético, la extracción de veneno requiere del ordeño de serpientes vivas, situación que además de estresar al animal, implica al operador el riesgo de ser atacado por la serpiente al momento de manipularla ^{73,74}. Por otro lado, considerando un aspecto logístico, mantener animales en cautiverio para este fin, supone proveer las condiciones mínimas necesarias para su bienestar, lo que conlleva numerosos gastos asociados, desde el espacio físico donde resida, su alimentación y otros insumos relacionados ^{73,74}. Por ello, la producción recombinante de componentes presentes en el veneno permite una producción continua, que pueda ser escalable e independiente del uso de animales, lo que favorece la investigación o fines traslacionales ^{73,74}.

La cantidad de veneno que puede producir una serpiente, así como su composición, están sujetos a diversos factores como la edad y el sexo de los ejemplares, pero también de su dieta y la región geográfica que habitan, además de las condiciones de cautiverio. Esto supone una gran variabilidad en la composición y disponibilidad de la muestra ^{3,74}.

Contrariamente, la producción recombinante en sistemas heterólogos ofrece un mayor control sobre la homogeneidad y la calidad de la muestra, así como la reproducibilidad de los resultados, manteniendo la consistencia tanto en rendimiento como en identidad entre los diferentes lotes de producción gracias a una gran trazabilidad ^{75,76}.

El control que se puede lograr de este modo, es de gran utilidad para estudios de estructura o función del analito. Más allá de las conformaciones nativas, es posible generar cambios en la secuencia de las moléculas a producir, como mutaciones específicas, que permiten recabar un mayor caudal de información ^{18,75}. Por ejemplo, se han generado mutaciones en el motivo de unión de la jerdostatina para evaluar cómo eso afecta su funcionalidad o especificidad por la integrina $\alpha 1\beta 1$. Así, la producción recombinante facilita los estudios de mutagénesis dirigida y ha permitido descubrir sitios de interacción o funciones de diferentes moléculas o estructuras ¹⁸.

Estas características hacen que la producción heteróloga sea una gran alternativa para el desarrollo de proteínas con aplicaciones biomédicas, permitiendo lograr productos de mayor pureza, más fáciles y baratos de producir y purificar, respaldados por la posibilidad de escalar y una muy buena trazabilidad ⁷⁶.

Las desintegrinas, al ser pequeños péptidos ricos en cisteínas que dependen del correcto emparejamiento de sus puentes disulfuros, pueden suponer un desafío para su expresión heteróloga. Sin embargo, se ha logrado producirlas en diferentes sistemas, con diferentes niveles de éxito ⁷⁷.

E. coli es el sistema de expresión heterólogo que más se ha utilizado para producir desintegrinas de forma recombinante ^{78,79}. Al tratarse de bacterias, es un modelo de bajo costo, de rápido crecimiento y de gran simplicidad genética, por lo que ofrece diversas posibilidades en cuanto a la expresión: citoplasmática, periplásmica (utilizando péptidos señal para la secreción) o mediante la construcción de proteínas de fusión ^{78,79}. Este último aspecto tiene como finalidad incluir otras proteínas que aumentan la solubilidad y evitan la degradación proteolítica. Algunos ejemplos de estas proteínas son la tiorredoxina A (TrxA), la proteína de unión a maltosa (MBP), glutatión S-transferasa (GST), entre otras ^{76,78,79}.

En algunos casos, las desintegrinas producidas en *E. coli* se acumulan en cuerpos de inclusión, requiriendo de su desnaturalización y posterior plegamiento oxidativo para promover la correcta formación de puentes disulfuro ^{76,78,79}, por lo que la estrategia de expresar una proteína de fusión para aumentar su solubilidad puede resultar favorable ^{76,79}.

Aumentando el nivel de complejidad del sistema hospedero, se han producido desintegrinas o dominios tipo desintegrina en levaduras, concretamente en *Pichia pastoris* ^{76,79,80}. Una de las ventajas que ofrece este sistema ante *E. coli* es el ambiente oxidativo favorable para la formación de los enlaces disulfuro ^{76,79,81}. Además, el proceso de purificación puede verse simplificado por la secreción de las proteínas recombinantes al medio de cultivo ^{79,80}. No obstante, las levaduras son capaces de modificaciones post-traduccionales como la N-glicosilación, por lo que la glicosilación no esperada puede ser un problema, especialmente en proteínas que naturalmente no están glicosiladas, como la desintegrinas, alterando su estructura y función ^{76,79,80}.

Por otro lado, la utilización de líneas de insecto para la expresión recombinante de las desintegrinas, puede ser otra alternativa. Dentro de las más usadas se encuentran High Five™ de *Trichoplusia ni* o Sf9/Sf21 (*Spodoptera frugiperda*) ^{79,81,82}. Las células de insecto constituyen un punto intermedio entre un sistema procariota y uno de células de mamífero: fácil mantenimiento, son robustas, de rápido crecimiento ^{81,82}. No obstante pero es un sistema caro que ofrece un rendimiento bajo aunque fácilmente escalable ^{81,82}. Además, son propicias para la formación de enlaces disulfuro en proteínas ricas en cisteínas y capaces de glicosilar proteínas, pero de forma más simple que las células de mamíferos ^{79,81,82}.

Se han producido dominios tipo desintegrina y proteínas ricas en cisteína de veneno en este sistema, que resultaron ser funcionales ^{76,81}.

Las células de mamíferos, son ideales para la producción recombinante de proteínas de origen eucariota, ofreciendo las mejores condiciones para un plegamiento nativo y procesamiento postraduccional correcto ^{76,79,83}. Aunque brinda mejores resultados que las células de insecto, estos sistemas implican un costo mucho más elevado, junto con largos períodos de producción, además de ofrecer un rendimiento más bajo ^{76,79}. No obstante, estos sistemas son los mejores para la producción de SVMP ^{76,79,83}.

Los sistemas de expresión “Cell-Free” se han utilizado como plataforma para la expresión de proteínas de veneno, incluyendo dominios tipo desintegrina ^{76,79,84}. A pesar de que no se han usado aún para la producción a gran escala, estos sistemas permiten un control fino en las condiciones redox ^{76,79,84}.

2. Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis general:

La jerdostatina recombinante posee propiedades inmunomoduladoras sobre la maduración de DC inducida por diferentes ligandos de TLR.

2.2 Objetivo general:

Producir jerdostatina de forma recombinante en sistemas heterólogos, purificarla y evaluar su efecto sobre la maduración y activación de las DC.

2.3 Objetivos específicos:

1. Producir y purificar jerdostatina recombinante en *E. coli* y en células S2 (*Drosophila melanogaster*) y purificarla.
2. Producir y purificar integrina $\alpha 1\beta 1$ recombinante en células S2.
3. Analizar la interacción entre jerdostatina e integrina $\alpha 1\beta 1$ como evaluación funcional.
4. Evaluar el efecto de la jerdostatina recombinante sobre la maduración y activación de DC.

3. Materiales y Métodos

3.1 Producción Recombinante

3.1.1 Plásmidos

Los plásmidos pET32-a/Jerdos y pDro-Ext/Jerdos fueron diseñados mediante el programa Snapgene® y sintetizados por GenScript (USA). Previo a su uso, se reconstituyeron en agua ultrapura a una concentración de 100 ng/μL. El plásmido p7_TEVdt, diseñado por Dalla Rizza y colaboradores fue cedido por el Laboratorio de Inmunovirología "Prof. Dr. Otto Pritsch" del Instituto Pasteur de Montevideo (IPMon)⁸⁵. El plásmido pCoPuro se adquirió en Thermo Fisher Scientific (USA).

3.1.2 Producción recombinante de jerdostatina en sistema heterólogo bacteriano (Jerdo-Ec)

El plásmido **pET32-a/Jerdos (Figura 12)** fue diseñado utilizando como referencia la secuencia nucleotídica de la jerdostatina, descrita por Sanz *et al.* (2005)¹⁸ (**Figura 13**) y el vector utilizado por Sanz-Soler *et al.* (2012)²³. El pET32-a es un vector de 5.9 Kb, utilizado para la expresión de péptidos y proteínas en *E. coli*, contiene el promotor T7 y el operador lac incorporado, permitiendo regular la expresión mediante el agregado de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Además, contiene la secuencia de la TrxA, que permite mejorar la solubilidad y el plegamiento de las proteínas, así como una etiqueta de poli-histidina (His-6x) (**Figura 13**) que son utilizados para facilitar la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés).

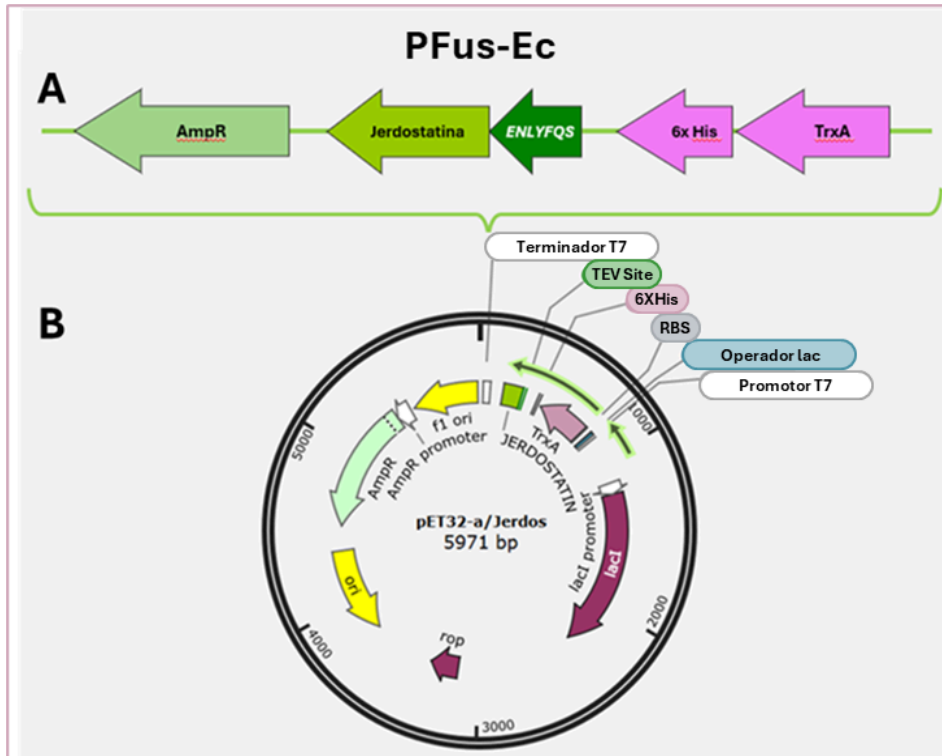


Figura 12: Representación de la proteína de fusión y el pET-32a/Jerdos. A) Secuencia de la proteína de fusión expresada en *E. coli* (PFus-Ec), comprendida por la jerdostatina (verde), la secuencia de corte para la enzima TEV (ENLYFQS), el His-tag (6x His) y la Tiorredoxina (TrxA). **B)** Mapa del plásmido pET-32a/Jerdos, diseñado para la expresión recombinante de la proteína en *E. coli*.

La secuencia de nucleótidos que codifica para la jerdostatina se insertó entre los pares de bases (pb) 161 y 289 del plásmido. Inmediatamente a ésta, entre los pb 290 a 309 se introdujo la secuencia que codifica para el sitio de corte de la enzima TEV (ENLYFQS), como se muestra en la **Figura 13**. De esta forma, la inducción del **pET-32a/Jerdos** resulta en la expresión de la proteína de fusión (PFus) comprendida por la jerdostatina, el sitio de corte para TEV, la TrxA y el 6xHis. La secuencia de corte para TEV permite la digestión de la PFus, pudiendo separar la jerdostatina del resto de la construcción.

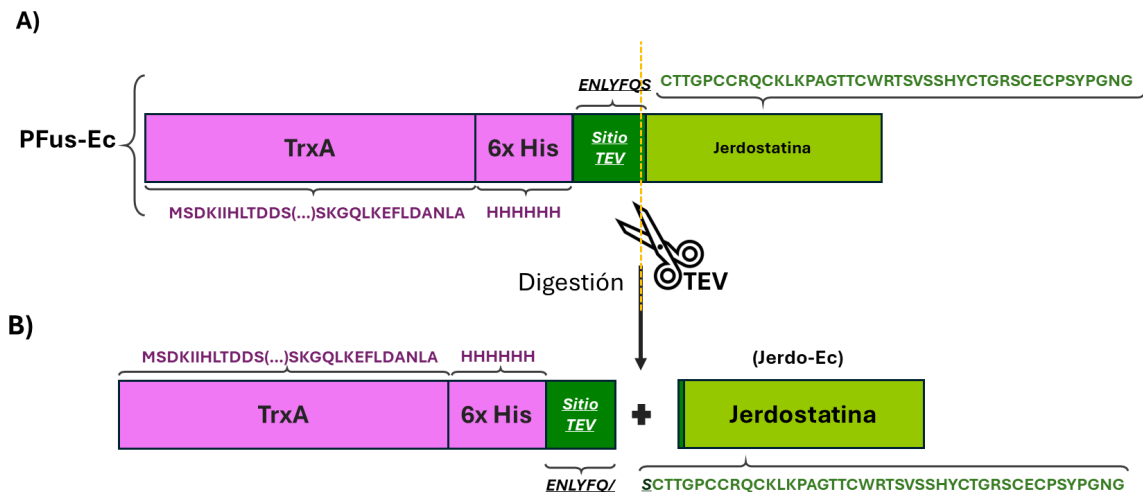


Figura 13: Esquema de la digestión de la proteína de fusión obtenida en *E. coli*. **A)** Representación de la estructura de PFus-Ec, producida en *E. coli* al inducir su expresión en bacterias transformadas con el plásmido pET-32a/Jerdos. Se indica el sitio de corte de TEV. **B)** La digestión de PFus-Ec con la enzima TEV permite obtener la jerdostatina aislada luego de purificarla por IMAC.

El clonado se realizó utilizando la cepa *E. coli* XL1 (XL1) (Agilent Technologies, USA), que al ser quimiocompetente, se transformó mediante shock térmico. Se incubaron 150 ng del plásmido con 50 μ L de XL1 durante 30 min en hielo. Luego, se incubó por 2 min a 42°C e inmediatamente se las devolvió al hielo por otros 2 min. Se añadieron 450 μ L de medio Lysogeny broth (LB) (1% triptona, 0,5% extracto de levadura, 0,5% NaCl, pH 7,2.) y se las incubó por 1 h a 37°C, en agitación a 300 rpm. Posteriormente, las bacterias se plaquearon en medio LB agar (1,5% de agar bacteriológico, 1% triptona, 0,5% extracto de levadura, 0,5% NaCl, pH 7,2.) suplementado con 100 μ g/mL de ampicilina y la placa se incubó toda la noche (ON) a 37°C.

Al día siguiente, se picó del agar una colonia aislada y se la añadió a 50 mL de LB con ampicilina (100 μ g/mL) para generar un cultivo que se incubó ON a 37°C a 200 rpm. El plásmido clonado se purificó a partir del cultivo, utilizando el Monarch® Plasmid Miniprep Kit (#T1010) de New England Biolabs (USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente la concentración del ADN plasmídico obtenido se midió por absorbancia a 260 nm.

Para la expresión del plásmido pET32-a/Jerdos se utilizó la cepa quimiocompetente *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS (Rosetta) (Merck, Alemania), que fue transformada por shock térmico, como se describió anteriormente para el clonado del plásmido en la cepa XL1. Las bacterias transformadas (200 μ L) fueron inoculadas en 50 mL de LB, que se incubaron en agitación a

200 rpm, ON a 37 °C. Al día siguiente, se tomaron 10 mL del precultivo y se agregaron a 1 L del medio Terrific Broth (TB) (1,2% triptona, 2,4% extracto de levadura, 0,4% glicerol, 17 mM KH_2PO_4 , 72 mM K_2HPO_4 , pH 7,2.) suplementado con sales de TB (KH_2PO_4 17 mM, K_2HPO_4 , 72 mM), glicerol 50% y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina. El cultivo se incubó nuevamente a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) de ~ 2. Luego, se indujo la expresión con 1 mM de IPTG durante 4 h adicionales. Posteriormente, se centrifugó a 4000 g, por 30 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en buffer de equilibrado (20 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 20 mM imidazol) añadiendo 2,5 UI/mL de DNAsa. La suspensión se almacenó a -20°C ON para favorecer la lisis celular. La lisis se realizó por sonicación en hielo; 15 ciclos (5 seg ON, 10 seg OFF con una amplitud entre 30-40%). El lisado se centrifugó a 30000 g por 30 min a 4° C, para separar las proteínas solubles de las fracciones insolubles y restos celulares.

La producción recombinante de la proteasa TEV se realizó de forma similar a la producción de Jerdo-Ec en Rosetta, como se describe en este punto.

3.1.3 Producción recombinante de jerdostatina en un sistema heterólogo eucariota (Jerdo-Dm)

Para la expresión de jerdostatina (Jerdo-Dm) en células Schneider 2 (S2) de *Drosophila melanogaster* se eligió el vector pMT/BiP/V5-his. Este vector cuenta con el gen de resistencia a la ampicilina, permitiendo la selección de cepas transformadas de *E. coli* para el clonado y a su vez, permite la expresión inducible en células de *D. melanogaster* utilizando cationes metálicos divalentes, como Cd^{2+} o Cu^{2+} , gracias al promotor de metalotioneína (**Figura 14**). El plásmido cuenta con una señal de exportación BiP que promueve la translocación de la proteína recombinante hacia el retículo endoplasmático y su secreción al medio extracelular ⁸⁶. Se añadió la secuencia de corte de la TEV (ENLYFQS) para su digestión luego de ser purificada. Para dicho fin, el plásmido pDro-Ext cuenta con la etiqueta Twin-Strep-tag® en el extremo N-terminal, permitiendo la separación por cromatografía de afinidad por Strep-tactin®.

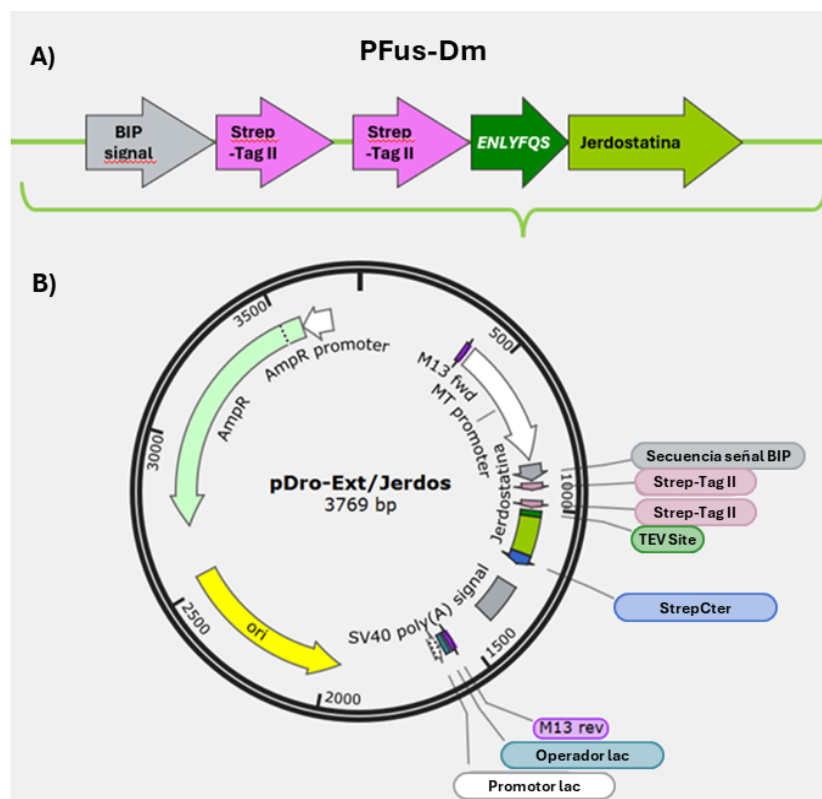


Figura 14: Representación de la construcción del vector para la expresión en S2. A) Diagrama que representa la construcción de la proteína de fusión en *D. melanogaster* (PFus-Dm). Incluye señal Bip, tags de purificación, sitio de corte para TEV y la jerdostatina. **B)** Mapa circular del plásmido pDro-Ext/Jerdos.

El plásmido pDro-Ext/Jerdos se clonó de forma similar a lo descrito para el plásmido pET-32a/Jerdos (apartado 6.2). Brevemente, se transformó a las XL1 por shock térmico, con 150 ng de plásmido (100 ng/ μ L). Las bacterias se plaquearon en LB agar con 100 μ g/mL de ampicilina y se incubaron a 37°C, ON. Al día siguiente, se picó una colonia y se generó un cultivo con 200 mL de LB (100 μ g/mL de ampicilina) que se dejó incubando ON a 37°C y 200 rpm.

Para la purificación, se utilizó e *PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit* (Thermo Fisher Scientific, #K210017) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se resuspendió el ADN obtenido en 200 μ L de agua ultrapura. La concentración se midió por absorbancia a 260 nm.

La expresión de la proteína recombinante Jerdo-Dm se realizó en células S2 adaptadas al crecimiento sin suero fetal, las cuales fueron cedidas por el Laboratorio de Inmunovirología "Prof. Dr. Otto Pritsch" (IPMon). Las células se cultivaron en flasks T25 en medio Insect-XPRESS (Lonza, Suiza) adicionado con penicilina y estreptomina (50 UI/mL y 50 μ g/mL, respectivamente) hasta una densidad aproximada de 5×10^6 células/mL. El mantenimiento (condiciones estáticas a 28 °C) y la expansión de las mismas se realizó a través de pasajes, añadiendo medio fresco a una parte del medio de cultivo, manteniendo la densidad entre 5 y 7×10^6 células/mL. A medida que el volumen de cultivo aumentó durante los pasajes, se requirieron flasks de mayor capacidad. Cuando se alcanzó un volumen de 20 mL, el cultivo se incubó por 72 h en un matraz de 100 mL a 28 °C con agitación a 100 rpm.

Para generar la línea estable, cuando el cultivo alcanzó una densidad de 1×10^8 células/mL, se centrifugó por 5 min a 200 g y temperatura ambiente (TA). Las células se resuspendieron en 400 μ L de *MaxCyte electroporation buffer* (Cytiva, USA) y se realizó la co-transfección de los plásmidos pDro-Ext/Jerdos y pCoPuro en una relación 2:1 (160 y 80 μ g, respectivamente). La electroporación se llevó a cabo en un electroporador EXPERT STx™ de MaxCyte (USA), siguiendo el protocolo del fabricante.

Para que se recuperen las células transfectadas, se agregaron 400 μ L de medio de cultivo y se incubaron durante 1 h. Luego, se transfirieron a matraces con medio fresco y se las incubó nuevamente a 28°C y 100 rpm.

El proceso de selección se realizó agregando 50 UI/mL de penicilina, 50 μ g/mL de estreptomina y 6 μ g/mL de puromicina al medio. Luego de 72 h, con una densidad celular aproximada de 5×10^6 células/mL, se realizó la inducción con 5 μ M de CdCl₂. Para seguir la expresión de la proteína, se tomaron muestras del sobrenadante a las 24, 48, 96 y 168 h, que luego fueron analizadas por Western blot, con un anticuerpo contra el Strep-tag.

3.1.4 Producción recombinante de la integrina $\alpha1\beta1$

En el marco de una pasantía en el laboratorio del Prof. Johannes Eble, de la Universität Münster (Alemania), se expresó y purificó el ectodominio de la integrina $\alpha1\beta1$ (**Figura 15**) a partir de células ya transfectadas con las secuencias que codifican para los dominios $\alpha1$ y $\beta1$ de la proteína ⁹³.

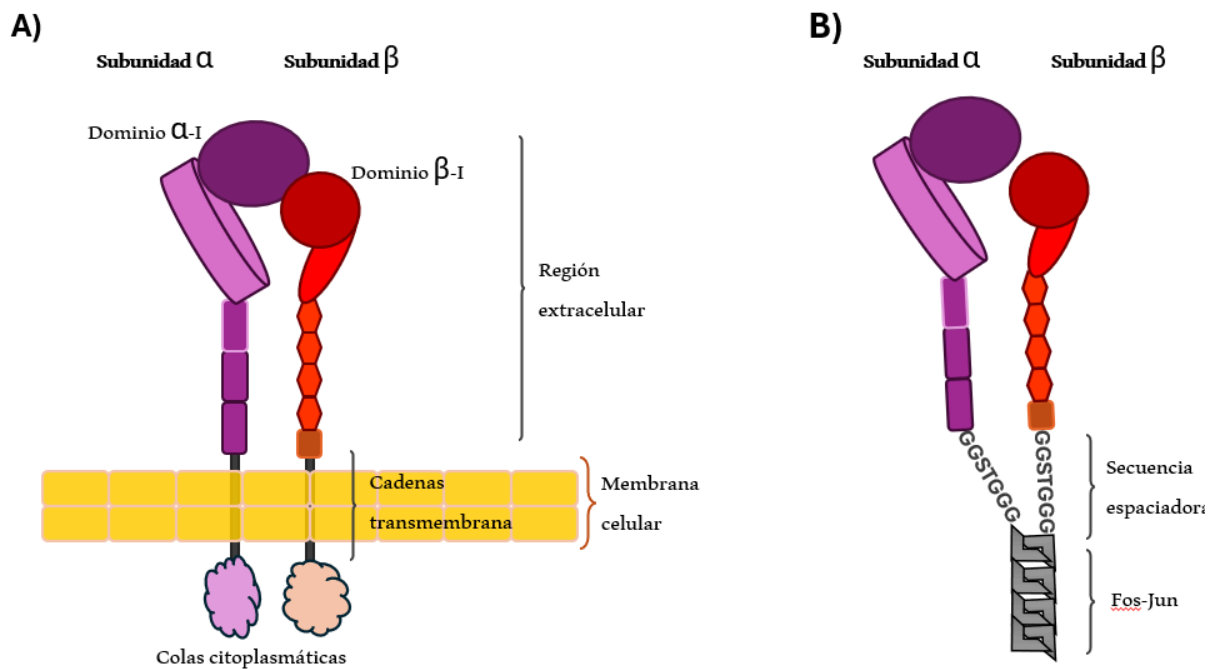


Figura 15: Estructura de la integrina $\alpha1\beta1$. **A)** Imagen representativa de la integrina $\alpha1\beta1$, con sus dominios extracelulares, las cadenas que la anclan a la membrana celular y la cola citoplasmática de cada dominio. **B)** Representación del ectodominio soluble expresado en las células S2. La región transmembrana y las colas citoplasmáticas se sustituyeron por secuencias espaciadoras y los motivos de dimerización Fos y Jun ⁸⁹.

De forma similar a lo descrito para la producción de la jerdostatina en el sistema heterólogo eucariota (Jerdo-Dm) S2 (punto 3.1.3), las células se crecieron en flasks y en sucesivos pasajes y expansiones se llevaron a frascos de agitación, hasta obtener una densidad entre $12 - 15 \times 10^6$ células/mL. Luego, se inició la expresión, añadiendo al medio; glucosa 0.1%, 0.8 mM de glutamina y 0.6 mM de sulfato de cobre en medio con 10% de suero fetal bovino (SFB). El cultivo se recogió a los 5 días y se centrifugaron las células a 10000 g, por 30 min a 4 °C. Se filtró el sobrenadante con papel Whatman N°1 (GE Healthcare, USA), se añadió 0,5 mM de Fluoruro de Fenilmetanosulfonilo (PMSF) y se concentró por ultrafiltración. Al sobrenadante concentrado se le agregaron inhibidores de proteasas (aprotinina, leupeptin y pepstatina a 1 μ g/mL y PMSF a 0,5 mM) junto con 1 mM de $MnCl_2$.

3.2 Purificación de proteínas recombinantes

3.2.1 Jerdo-Ec

La PFus-Ec y Jerdo-Ec se purificaron utilizando la matriz de afinidad Ni-Sepharose® (Cytiva), agregando ~ 1 mL de resina cada 80 mL de muestra e incubando entre 30 – 60 min en agitación a TA. La mezcla se agregó a una columna abierta, conectada a una bomba peristáltica. Luego de recolectar el percolado (fracción no unida), se lavó la columna con 15 mL buffer de equilibrado (20 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 20 mM imidazol) y finalmente se eluyó la PFus en buffer de elución (20 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 500 mM imidazol). Las fracciones obtenidas se analizaron por SDS-PAGE y su concentración fue cuantificada por absorbancia mediante el método de ácido bicinconínico (BCA). Para separar la jerdostatina del resto de PFus-Ec, fue necesario realizar una digestión con TEV, añadiendo 1 mg de enzima cada 10 mg de PFus-Ec.

La digestión se realizó ON, a 4°C en buffer de diálisis (20 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM Ditiotretitol (DTT)), con una membrana de 3,5 kDa, SnakeSkin 3.5K MWCO (Thermo Fisher Scientific). La incorporación de DTT se realiza para prevenir la oxidación de residuos de cisteína de la TEV y así mantener una elevada actividad enzimática.

Se recuperó la mezcla de digestión y se la purificó por IMAC de igual forma a lo descrito para PFus-Ec. De las fracciones obtenidas de la purificación, la jerdostatina se encontró en el percolado, la fracción no retenida en la columna.

La concentración de la jerdostatina presente en el percolado se midió por BCA y se analizó por SDS-PAGE. Adicionalmente, se confirmó su identidad por espectrometría de masas en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica del IPMon.

3.2.2 TEV

Para la digestión de la PFus-Ec se utilizó TEV, que fue expresada y purificada en el contexto de esta tesis, a partir del plásmido p7_TEVdt⁸⁵. El procedimiento para la purificación de la TEV fue el mismo que se describió en el punto anterior (3.2.1). La concentración de proteína se midió por absorbancia a 280 nm y su pureza se analizó por SDS-PAGE.

3.2.3 Integrina $\alpha 1\beta 1$

Para la purificación de la integrina $\alpha 1\beta 1$, se cargó el sobrenadante ON a 4 °C en una columna empaquetada con Sepharose 4B CL unida covalentemente al fragmento CB3 del

colágeno tipo IV. Se recogió el precolado y se lavó la columna con buffer de equilibrado (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂). Posteriormente, la integrina $\alpha 1\beta 1$ se eluyó utilizando un buffer Tris salino (TBS) (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl) adicionado con EDTA 20 mM. Inmediatamente, a las fracciones eluidas se les añadió 120 μ l de MgCl₂ 1 M y 80 μ l de Tris-HCl 2 M, para evitar su oxidación y ajustar el pH. Finalmente, la muestra se concentró por ultrafiltración y se realizaron lavados con buffer Tris 20 mM, adicionado con 2 mM de MgCl₂ y 0,02% de azida de sodio, para eliminar el EDTA del buffer de elución. Posteriormente, se cuantificó la concentración mediante BCA y se analizó por SDS-PAGE y Western blot.

3.3 Análisis de proteínas

Los siguientes ensayos se realizaron con el fin de poder determinar la concentración o identificar la presencia de las proteínas de interés.

3.3.1 Cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinconónico

Para cuantificar las proteínas se utilizaron 10 μ L de muestra en una placa de 96 pocillos, a los que se les añadió una mezcla de la solución de BCA y una solución de sulfato de cobre 4%, preparada en una proporción 50:1 (Sigma-Aldrich, USA). La placa se incubó a 37° C por 30 min. Finalmente se midió la absorbancia de las muestras a 562 nm⁸⁷.

3.3.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes

Las proteínas se analizaron mediante electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) utilizando un gel de poliacrilamida al 15% o en gradiente de 5 a 12% en condiciones reductoras. Para preparar las muestras, se les añadió buffer de carga (500 mM DTT, 310 mM Tris pH 6,8, 50% glicerol, 10% SDS, 0,05% azul de bromofenol) y se las incubó a 95 °C entre 5 y 10 min.

Los geles se corrieron a corriente constante de 20 mA, o bien, a 180 mV y entre 18 y 22 mA, en buffer de corrida (192 mM glicina, 25 mM Tris, 0,1% SDS). Para visualizar las bandas se utilizaron tanto la solución de azul de Coomassie, como tinción de nitrato de plata.

La tinción con solución de azul de Coomassie (45% etanol, 10% ácido acético, 2,5% azul de Coomassie R-250), se llevó a cabo durante aproximadamente 30 min, en agitación. Pasado ese tiempo se procedió a remover la tinción utilizando dos soluciones de desteñido; la solución 1 (40% etanol, 7% ácido acético) por 1 h y la solución 2 (7% ácido acético, 5% etanol), el tiempo necesario para visualizar las bandas correctamente.

La tinción de nitrato de plata se realizó en distintos pasos. Se inició con dos lavados de 20 min con la solución de lavado (30% etanol, 10% ácido acético). Se fijaron las proteínas durante 1 h con la solución de fijado (100 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 30 % etanol, 10% acetato de sodio 4 M, 0,4% ácido acético y 0,25% glutaraldehído). El gel se lavó tres veces por 5 min con agua destilada y luego se incubó por 1 h en solución de tinción (100 mg AgNO_3 , 0,0025% formaldehído). Pasado este tiempo, se añadió la solución de desarrollo de color (5% Na_2CO_3 , 0,0025% formaldehído) y se dejó reposar entre 5 y 15 min dependiendo de la

intensidad de las bandas. Finalmente se detuvo la reacción añadiendo 7% de ácido acético

88

Se usó el marcador de peso molecular PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa (Thermo Fisher Scientific, #26619, USA).

3.3.3 Dot blot

Se sembraron spots del sobrenadante de cultivo de las células S2 transfectadas con el plásmido pDro-Ext/Jerdos. Las muestras correspondientes a los sobrenadantes tomados a 24, 48, 96, 168 h y un concentrado de una fracción del sobrenadante de 168 h, que se preparó utilizando beads magnéticas MagStrep® Strep-Tactin®XT de (Iba Lifesciences, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante.

Luego de tres lavados de 5 min con PBS-T 0,1%, se bloqueó la membrana con buffer de bloqueo (PBS, 0,05% Tween 20 y 3% BSA) ON a 4 °C. Al otro día, se lavó tres veces y se incubó 1 h con Strep-Tactin-HRP en PBS-T 0,1% y BSA 0,2%. Pasado ese tiempo, se lavó dos veces con PBS-T 0,1% por 1 min en agitación, seguido de otros dos lavados con PBS. El revelado se realizó con el kit SuperSignal® West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, #34577).

3.3.4 Western blot

La detección de la Jerdo-Dm se realizó a partir de un SDS-PAGE desnaturalizante, seguido de una transferencia húmeda a una membrana de nitrocelulosa Amersham Protran Premium 0.45 µm NC (Cytiva). La transferencia se realizó a 50 mA, ON a 4°C. Al finalizar la misma, se incubó la membrana en buffer de bloqueo (PBS, 0,05% Tween 20 y 3% BSA) a 37°C durante 2 h. Se lavó la membrana tres veces con buffer de lavado (PBS, 0,1% Tween 20) (PBS-T) por 5 min en agitación. Posteriormente, la membrana se bloqueó con BioLock Biotin (IBA Lifesciences, Alemania) en PBS-T y se incubó por otros 10 min. Esta solución sirve para neutralizar posibles señales inespecíficas de proteínas biotiniladas. Pasado este tiempo, se incubó con Strep-Tactin-HRP en PBS-T 0,1% y BSA 0,2% durante 1 h. Se lavó dos veces con PBS-T 0,1% por 1 min en agitación, seguido de otros dos lavados con PBS. El revelado se realizó con el kit SuperSignal® West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate.

La detección de la integrina $\alpha 1\beta 1$ se realizó por transferencia húmeda a 160 mA, 80 V, 50 W, durante toda la noche a 4°C. La membrana se bloqueó con una solución de TBS, 0,1% Tween 20 y 5% de leche, en agitación durante 1 h. La incubación del anticuerpo primario anti-subunidad $\beta 1$ (suero policlonal cedido por el Prof. Eble) se realizó a TA, durante 2 h,

con una dilución 1/2000 en solución de bloqueo. Se lavó la membrana tres veces con TBS, 0,1% Tween 20 (TBS-T) por 5 min. Se procedió a incubar el anticuerpo secundario α -Rabbit-HRP, en similares condiciones. Se lavó tres veces con TBS-T y se reveló con el kit de Pierce ECL-Western Blotting Substrate (Thermo Scientific).

3.3.5 Espectrometría de masas

El análisis de la jerdostatina expresada en *E. coli* se realizó en un espectrómetro Orbitrap Exploris™ 240 Mass Spectrometer, asociado a un nano-HPLC Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific), que fue operado por el personal de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica del IPMon y utilizando el programa PatternLab V.

El análisis de proteínas se ordenó con máxima parsimonia, según el número total de espectros asignados a cada proteína que sirve como indicador de su abundancia.

Para tratar las muestras, se las redujo con DTT 10 mM y se las alquiló con iodoacetamida 55 mM. Se las digirió ON con tripsina y se resuspendió la muestra en 10 μ L de 0,1% ácido fórmico.

3.4 Ensayos de interacción

3.4.1 Unión de integrina $\alpha 1\beta 1$ al colágeno y CB3

Para evaluar la interacción de la integrina $\alpha 1\beta 1$ con el colágeno tipo IV o el fragmento CB3 del colágeno tipo IV se realizó un ensayo de tipo ELISA según lo reportado por Bolás *et al.* (2014) ²⁴. Se sensibilizó una placa de 96 pocillos con 100 μL de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CB3 (cedido por el Prof. Johannes Eble) o con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ colágeno tipo IV en TBS/ Mg^{2+} (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl y 2 mM MgCl_2) ON a 4 °C. Se lavó tres veces con TBS/ Mg^{2+} y se bloqueó con buffer de bloqueo (TBS/ Mg^{2+} y 1% BSA) a 37 °C durante 1 h. Pasado este tiempo, se realizaron (por duplicado) diluciones seriadas al tercio de integrina $\alpha 1\beta 1$, comenzando desde 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en buffer de bloqueo conteniendo 1 mM MnCl_2 (catión necesario para la unión del ligando) y se incubó nuevamente a 37 °C durante 1 h. Se realizaron dos lavados con 50 mM de Ácido 2-(4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil) etanosulfónico (HEPES), pH 7.5, 150 mM de NaCl, 2 mM de MgCl_2 y 1 mM MnCl_2 y se fijó la integrina unida con glutaraldehído 2.5% en HEPES, durante 10 min. Se lavó tres veces con TBS/ Mg^{2+} y se añadió el anticuerpo anti- $\beta 1$ de conejo en buffer de bloqueo. Tras otros tres lavados con TBS/ Mg^{2+} , se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a la peroxidasa de rábano (HRP) (Pierce), durante 1 h a 37 °C. El revelado se realizó con O-Phenylenediamine (OPD) (Sigma-Aldrich, USA) y 4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de peróxido de hidrógeno en buffer citrato-fosfato 0.1 M, pH 5. La reacción se detuvo utilizando ácido clorhídrico 3 M y el desarrollo de color fue cuantificado con un lector de placas (Labsystems Multiskan MS) midiendo absorbancia a 492 nm.

3.4.2 Unión de jerdostatina a la integrina $\alpha 1\beta 1$

De forma similar a lo descrito anteriormente, se realizó un ensayo de unión entre la jerdostatina y su ligando, la integrina $\alpha 1\beta 1$. Para ello se inmovilizó en una placa de 96 pocillos, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Jerdo-Ec en buffer TBS/ Mg^{2+} ON a 4 °C. Luego de tres lavados con TBS/ Mg^{2+} y se bloqueó con TBS/ Mg^{2+} , 1% BSA, a 37°C durante 1 h. La integrina $\alpha 1\beta 1$ recombinante se agregó en diluciones seriadas al tercio (y por duplicado), a partir de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en buffer de bloqueo y se incubó 1 h a 37°C. Se realizaron dos lavados con HEPES y se fijó la integrina con glutaraldehído por 10 min. Se lavó con buffer TBS/ Mg^{2+} y se incubó 1 h a 37°C con anticuerpos anti- $\beta 1$ de conejo en buffer de bloqueo. Pasado ese tiempo y realizados tres lavados, se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo HRP durante 1 h a 37°C. Tras 5 lavados con TBS/ Mg^{2+} , se reveló con OPD y se registró la absorbancia a 492 nm, como se indicó anteriormente.

3.4.3 Bloqueo de la unión integrina $\alpha 1\beta 1$ - colágeno IV

Para analizar la capacidad de la Jerdo-Ec de bloquear la interacción entre la integrina $\alpha 1\beta 1$ y el colágeno IV o el fragmento CB3, llevamos a cabo un ensayo similar al descrito en el punto 3.4.1. Se sensibilizó una placa con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CB3 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de colágeno IV y se incubó ON a 4 °C. Luego de los primeros lavados, se bloqueó durante 1 h a 37 °C (TBS/ Mg^{2+} , 1% BSA). Tras lavar, se añadió por duplicado una mezcla preincubada (1 h, 37 °C) de 3 o 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de integrina $\alpha 1\beta 1$ con diferentes concentraciones de jerdostatina (50, 5, 1, 0.5 y 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubó por 1 h a 37°C. Posteriormente, se realizaron los respectivos lavados con HEPES y se fijó la integrina $\alpha 1\beta 1$ unida. Luego de los lavados, se incubó con los anticuerpos de conejo contra la subunidad $\beta 1$ en buffer de bloqueo, a 37 °C por 1 h. Se lavó tres veces con TBS/ Mg^{2+} y se añadió el anticuerpo secundario contra conejo conjugado a HRP, preparado e incubado en iguales condiciones que el anti- $\beta 1$. A continuación, la placa se lavó cinco veces y se realizó el revelado con OPD, como se describió anteriormente. La absorbancia se leyó a 492 nm.

3.5 Ensayos con DC

3.5.1 Maduración y activación de DC

Se generaron células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) a partir de precursores de tibia y fémur de ratones C57BL/6. Estos precursores se cultivaron en placas de Petri a una concentración final de 8×10^6 células/placa, en medio RPMI suplementado con 10% de SFB, 1% de penicilina-estreptomicina, con 10 ng/mL de Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF) (Peprotech) por un período de siete días. Al cuarto día se realizó un refuerzo de medio con 10 ng/mL de GM-CSF. Al séptimo día se colectaron las células y se las incubó con 1 mM de EDTA durante 10 min a 37 °C para despegarlas. Se centrifugaron por 10 min a 1500 rpm y se contaron en el microscopio. Posteriormente se dispensaron 0.25×10^6 células/pocillo junto 50 µg/mL de jerdostatina durante 2 h a 37 °C. Pasado este tiempo, se incubaron con 50 µl de los siguientes ligandos de TLR: (1 µg/mL LPS, 1 µg/mL PAM2CSK, 10 µg/mL Poly:IC, 1 µg/mL 1 µg/mL zimosan o 1 µg/mL R848 en presencia o ausencia de polimixina B (1 µg/mL) y se incubó por 18 h a 37 °C.

3.5.2 Citometría de flujo

Para caracterizar la expresión de las moléculas de coestimulación (CD40 y CD86) y MHC de clase II en BMDC (células CD11c+), se realizaron análisis de citometría de flujo utilizando anticuerpos marcados con sondas fluorescentes.

Brevemente, las células fueron colectadas, lavadas 2 veces con buffer FACS (PBS conteniendo 2% SFB) y se dispensaron 200.000 cél/pocillo en placas con pocillos de fondo cónico. Posteriormente, se realizó una mix donde se agregaron 50 µl de las diluciones de los anticuerpos marcados en buffer FACS: anti-CD11c-PECy7 (para la identificación de las BMDC), además de anti-CD40-FITC, anti-CD86-APC y anti-MHCII-PE (Tabla 3) y se incubaron por 45 min en la heladera (4 °C). Pasado ese tiempo se lavaron las células dos veces por centrifugación con buffer FACS a 2000 rpm por 2 minutos. Se utilizaron controles de marcado simple (mono marca), FMO (Fluorescence minus one) y sin marca para compensar las longitudes de onda de los fluoróforos, y el doble negativo de las poblaciones celulares, respectivamente.

El gating de la población CD11c+ se determinó mediante Forward y Side scattering (FSC y SSC). La población positiva para CD11c+ fue seleccionada para el análisis de la expresión de las moléculas de coestimulación y MHCII, donde se adquirieron 10,000 eventos de células CD11c+. Los datos fueron analizados con el software BD CSampler™, en un citómetro BD Accuri™ C6 plus.

Tabla 3: Dilución y concentración de los anticuerpos utilizados para la marcación de las DC y sus moléculas expresadas durante su maduración y activación.

Anticuerpo	anti-CD11c	anti-CD40	anti-CD86	anti-MHCII
Clon	N418	HM40-3	GL1	M5/114.15.2
Stock	0.5 mg/mL	0.5 mg/mL	0.25 mg/mL	0.5 mg/mL
Dilución	1/400	1/400	1/200	1/2000
Uso	1,25 µg/mL	1,25 µg/mL	2,5 µg/mL	0,25 µg/mL
Fluoróforo	PECy7	FITC	APC	PE

3.5.3 ELISA sándwich para la cuantificación de citoquinas

Se analizó la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-6 e IL-12p70) mediante un ELISA tipo sándwich, utilizando anticuerpos de BD Bioscience o Biolegend.

Se sensibilizaron placas NUNC maxisorp® con anticuerpos específicos (**Tabla 4**) contra las mencionadas citoquinas, en buffer fosfato 100 mM, pH 9, ON a 4 °C. Las placas se lavaron con PBS-T y se las bloqueó con PBS, 1% gelatina en PBS durante 1 h a 37 °C. Tras tres lavados se incubaron los sobrenadantes provenientes de los cultivos de BMDC diluidos en 0,5% gelatina en PBS-Tween 0,05%, por 1 h a 37 °C. Luego de la incubación, se realizaron tres lavados y se procedió a incubar en iguales condiciones, una dilución del anticuerpo secundario. Se lavó tres veces y se incubó una solución de estreptavidina-HRP en 0,5% gelatina en PBS-Tween 0,05% por 1 h a 37°C. Tras los últimos tres lavados se reveló con OPD, se detuvo la reacción con HCl 3 M y se midió la absorbancia a 492 nm. Para la cuantificación, se realizó una curva de calibración utilizando un estándar tratado de igual forma que las muestras.

Tabla 4: Dilución y concentración de los anticuerpos utilizados para el ELISA de citoquinas.

Anticuerpo	anti-IL6	anti-IL12p70	anti-IL6 (biotinilado)	anti-IL-12p70 (biotinilado)
Clon	MP5-20F3	C15.6	MP5-32C11	C17.8
Stock	1 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,5 mg/mL
Dilución	1/1000	1/500	1/1000	1/500
Uso	1 µg/mL	2 µg/mL	0,5 µg/mL	1 µg/mL

4. Resultados

4.1 Producción recombinante de jerdostatina en sistema heterólogo bacteriano

La expresión de la jerdostatina recombinante se llevó a cabo en dos sistemas celulares diferentes: bacteriano y eucariota. Para ello se diseñaron los plásmidos pET-32a/Jerdos y pDro-Ext/Jerdos, que fueron clonados en bacterias *E. coli* de la cepa XL1. Se transformaron las bacterias por shock térmico y luego se plaquearon en medio LB-Agar con 100 µg/mL de ampicilina, para que sólo crecieran las bacterias transformadas, dado que ambos plásmidos presentan genes que confieren la resistencia al antibiótico. Se picó una colonia aislada del agar y se creció un cultivo en LB durante toda la noche a 37°C, del cual, luego de una miniprep (para pET-32a/Jerdos) o una maxiprep (pDro-Ext/Jerdos), se purificaron los plásmidos clonados. La concentración de ambos plásmidos se midió por espectrofotometría, midiendo su absorbancia a 260 nm. Los resultados se indican en la **Tabla 5**.

El coeficiente 230/260 permite identificar posibles contaminantes en la muestra, tales como fenoles residuales del proceso de extracción de ADN, así como algunos tipos de sales, como las de guanidinio. Para este coeficiente, valores menores a 2,0 son indicativos de impurezas en la muestra.

Por otro lado, una muestra de ADN con un coeficiente 260/280 de entre 1,7 y 2,0 se considera pura. Valores inferiores a 1,7 indican la presencia de proteínas, fenoles y otros contaminantes que absorben cerca de 280 nm.

Tabla 5: Cuantificación de los plásmidos pET-32a/Jerdos y pDro-Ext/Jerdos purificados.

Plásmido	Abs 260 nm	Concentración (ng/µL)	Coficiente 260/230	Coficiente 260/280
pET-32a/Jerdos	3,01	150,41	2,0	1,87
pDro-Ext/Jerdos	138,86	6942,96	2,2	1,91

Se indican parámetros relacionados a los valores de absorbancia medidos para los plásmidos luego de su clonación en la cepa XL1 y posterior purificación; Absorbancia a 260 nm, la concentración en ng/µL y los coeficientes a 260/230 y 260/280, indicativos de la pureza.

Para la expresión del plásmido pET-32a/Jerdos se utilizó la cepa Rosetta de *E. coli*, cedida por el Dr. Martín Fló. La ventaja de utilizar esta cepa reside en su capacidad de mejorar la expresión de proteínas de origen eucariota que puedan requerir de codones rara vez utilizados por las bacterias, por lo que no fue necesario optimizar la construcción para los codones que utiliza *E. coli*.

Para que las bacterias internalizaran el plásmido, se las transformó por shock térmico y se procedió a plaquearlas en LB-agar suplementado con ampicilina. A partir de una colonia aislada, se generó un precultivo en LB y al día siguiente, se generó un nuevo cultivo en TB. Cuando se alcanzó una OD₆₀₀ de 2, se indujo la expresión de la proteína Jerdo-Ec con 1 mM de IPTG durante 4 horas a 37 °C. El cultivo se centrifugó, el *pellet* se resuspendió en buffer de equilibrio y se congeló a -20°C, ON para favorecer la lisis. Al otro día, la suspensión se descongeló, se lisó por sonicación y se centrifugó para eliminar las fracciones insolubles y restos celulares.

La proteína de fusión (PFUs-Ec) se purificó del sobrenadante del lisado de las bacterias transformadas con pET-32a/Jerdo. Se realizó una IMAC en columna abierta, conectada a una bomba peristáltica. El sobrenadante se incubó con la resina y se cargó a la columna, donde se obtuvieron tres fracciones; el percolado, el lavado y el eluido. El primero correspondió a la fracción no unida a la resina, el lavado permitió remover moléculas unidas de forma no específica y finalmente el eluido fue la fracción donde encontramos la proteína de interés. La construcción de la PFUs-Ec contiene un His-tag que permite su unión a las resinas de níquel, por lo que la elución se realizó con un buffer con una elevada concentración de imidazol (500 mM).

La expresión de PFus-Ec y las fracciones de su purificación se analizaron por SDS-PAGE en gel de acrilamida 15%, que fue teñido con solución de azul de coomassie. En la **Figura 16** se observa el resultado de dicho análisis.

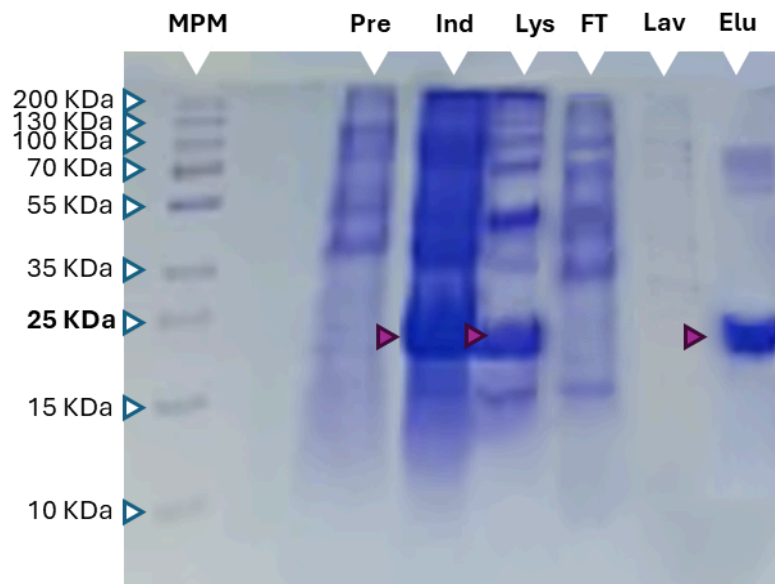


Figura 16: Expresión y purificación de Jerdo-Ec en *E. coli* Rosetta. SDS-PAGE reductor en gel de acrilamida 15%, sembrado con 20 µg de fracciones solubles del proceso de producción y purificación de PFus-Ec. Carriles: Marcador de peso molecular (**MPM**), cultivo de Rosetta Pre-inducción con IPTG (**Pre**), cultivo de Rosetta Post-inducción con IPTG (**Ind**), cultivo de Rosetta Post sonicado (**Lys**), Percolado (**FT**), Lavado (**Lav**) y Eluido (**Elu**). Todas las muestras fueron preparadas en buffer de carga reductor e incubadas a 98 °C por 10 min. Las flechas moradas señalan la banda correspondiente a PFus-Ec (21,8 kDa).

En el carril **Pre**, que corresponde a una muestra del cultivo de Rosetta previo a su inducción, se sembró a modo de control negativo de la expresión de PFus-Ec. El plásmido pET-32a/Jerdos cuenta con un promotor inducible, la expresión de la proteína sólo debería verse al inducir el cultivo con IPTG. El carril contiguo **Ind**, es una muestra del mismo cultivo de Rosetta al que se le añadió 1 mM de IPTG, donde se observa una banda por debajo de 25 kDa que correspondería a PFus-Ec, cuyo peso es de 21,8 kDa, señalada en la **Figura 16** con una flecha morada. En **Lys** se sembró una muestra del sobrenadante de cultivo luego de la lisis por sonicación, para conservar únicamente las fracciones solubles. Allí también se observa una banda que coincide con la proteína de fusión, concordante con la banda que se observa en **Ind** y no está presente en **Pre**. Los últimos tres carriles corresponden a las fracciones de la purificación por IMAC. En los carriles **FT** y **Lav** no se observa, como esperado, ninguna banda correspondiente a **PFus-Ec**, puesto que la misma quedó retenida en la columna y fue eluida con el buffer de elución (**Elu**). La intensa banda que se observa en este último carril por debajo de 25 kDa coincide con la misma que se observa en los carriles **Ind** y **Lys**, luego de inducir el cultivo, por lo que podría indicar que se trata de PFus-Ec (21,8 kDa). Por último, la cuantificación de las fracciones eluidas indicaron que, por cada litro de cultivo, se obtuvieron ~1,1 mg de PFus-Ec.

Como se mencionó en la sección de Materiales y Métodos, la proteína de fusión PFus-Ec obtenida, contiene un His-tag y TrxA para permitir su purificación por IMAC y aumentar su solubilidad, respectivamente. Por lo tanto, una vez purificada PFus-Ec, fue necesario separar la desintegrina del resto de la construcción, para lo que se incluyó en la secuencia del plásmido un sitio de corte para la proteasa TEV, como se muestra en la **Figura 13**.

Para la digestión con TEV, se expresó la enzima de forma recombinante, transformando bacterias de la cepa Rosetta con el plásmido p7_TEVdt, gentilmente cedido por el Dr. Martín Fló. Este plásmido permite generar una TEV recombinante con un doble tag de purificación (His-Tag y StrepTagII). La transformación, la producción y posterior purificación de TEV se

realizaron siguiendo los mismos procedimientos descritos para PFus-Ec. El análisis de la purificación de la proteína se realizó mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras (**Figura 17**), en gel de acrilamida al 15%, sembrando 1 µg de la enzima purificada, previamente incubada 10 min a 95 °C en buffer de carga reductor. En el carril **TEV** se puede apreciar una banda por encima de los 25 kDa, señalada con una flecha anaranjada, que concuerda con lo esperado para la enzima TEV, cuyo peso molecular es de 27 kDa. La concentración de la fracción purificada de TEV, medida por absorbancia, fue de 16 mg/mL.

Después de obtener purificada la enzima TEV, se la dializó junto con PFus-Ec en una relación 1:10, durante toda la noche a 4 °C. La diálisis se realizó en buffer fosfato (20 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM DTT), en una membrana con un tamaño de poro de 3,5 kDa. De esta forma se llevó a cabo la digestión de PFus-Ec, para separar Jerdo-Ec del resto de la proteína de fusión, como se muestra en la **Figura 18**. Pasado el tiempo, se recogió la mezcla de digestión y se cargó en una columna abierta con resina de níquel para la purificación de Jerdo-Ec, procediendo de la misma forma que se describió para la purificación de PFus-Ec.

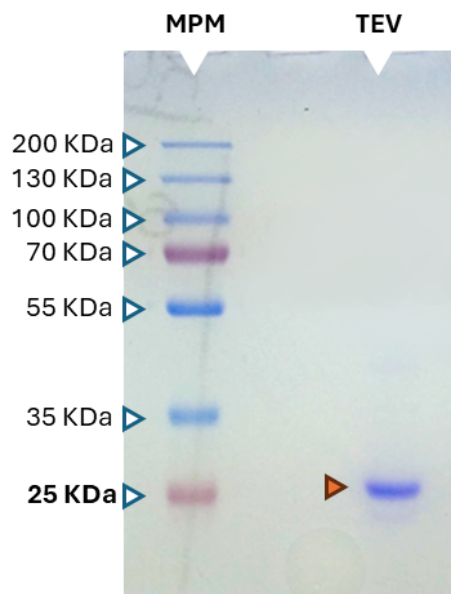


Figura 17. Análisis de la purificación de la enzima TEV obtenida por IMAC por SDS-PAGE en condiciones reductoras. Gel de acrilamida al 15% sembrado con el marcador de peso molecular (**MPM**) y una fracción de la enzima **TEV** purificada por IMAC, expresada de forma recombinante en Rosetta, con 1 mM de IPTG, a 20 °C, ON. El gel se tiñó con solución de azul de Coomassie, que se removió posteriormente con solución de *destain*. La flecha anaranjada señala el peso esperado para la TEV.

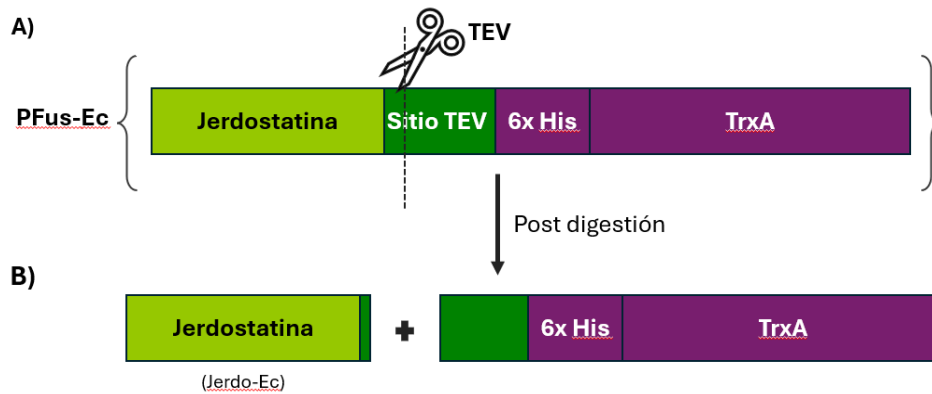


Figura 18. Esquema de la digestión de PFus-Ec con la enzima TEV. **A)** Se representa PFus-Ec que se obtiene de la expresión del plásmido pET-32a/Jerdos. La línea punteada indica el lugar donde la enzima TEV (ejemplificada como una tijera) corta la secuencia (sitio TEV). **B)** Proteínas obtenidas luego de la digestión por TEV: Jerdo-Ec y sitio TEV-6x His-TrxA

Finalizado el proceso de purificación por IMAC, se analizaron las fracciones por SDS-PAGE en condiciones reductoras. Las muestras se prepararon con buffer de carga reductor, se desnaturalizaron a 95 °C durante 10 min y se sembraron 10 µg de cada muestra en un gel de acrilamida 15%. Al finalizar la electroforesis, el gel se tiñó con solución de azul de coomassie y luego se destiñó, permitiendo observar el patrón de migración de las proteínas sembradas (**Figura 19**). Para analizar la digestión se sembró PFus-Ec previamente purificada (**PFus**), la enzima **TEV**, una muestra de la mezcla de digestión dializada (**Dig**) y las fracciones de la purificación de dicha mezcla para separar Jerdo-Ec; percolado (**FT**), lavado (**Lav**), y eluido (**Elu**). La banda señalada en **PFus**, migró ligeramente por debajo de los 25 kDa, siendo lo esperado para la PFus-Ec de 21,8 kDa. **TEV**, señalada en anaranjado, se visualizó por encima de los 25 kDa, correspondiente con el peso de la enzima (27 kDa). La mezcla de digestión, donde se dializó PFus-Ec en conjunto con TEV, se sembró en el carril **Dig**. Allí se esperaba visualizar diversas bandas; aproximadamente a los 27 kDa (la enzima TEV), a los 15 kDa (flecha blanca) la proteína de fusión digerida y por debajo de los 10 kDa, otra banda correspondiente a Jerdo-Ec, cuyo peso molecular es de 4,6 kDa (flecha verde). Por otro lado, en la fracción no unida (**FT**) se esperaba visualizar una banda de peso inferior a 10 kDa. Al escindir Jerdo-Ec de PFus-Ec, no quedó retenida en la columna debido a que ya no se encuentra unida al His-tag, lo que coincide con la banda señalada en este carril. Por esta razón, el resto de la proteína de fusión (~17 kDa) fue removida de la resina con el buffer de elución, como se aprecia **Elu** (flecha blanca).

No obstante, la digestión de PFus no fue total, ya que tanto en **Dig**, como en **Elu** se puede observar una banda correspondiente a PFus sin digerir, en torno a los 25 kDa (flecha

morada). La presencia de la banda en estos carriles es coherente, ya que la presencia del His-tag la mantiene unida a la resina hasta que la separa con el buffer de elución, cuya concentración de imidazol es muy elevada.

Luego de la digestión de PFus con TEV, se observó la formación de un precipitado insoluble, posiblemente debido a la pérdida de solubilidad por la separación de Jerdo-Ec de la TrxA (PFus). Esto provocó una disminución del rendimiento post digestión, sin embargo, se obtuvieron ~ 0,56 mg de Jerdo-Ec, por litro de cultivo.

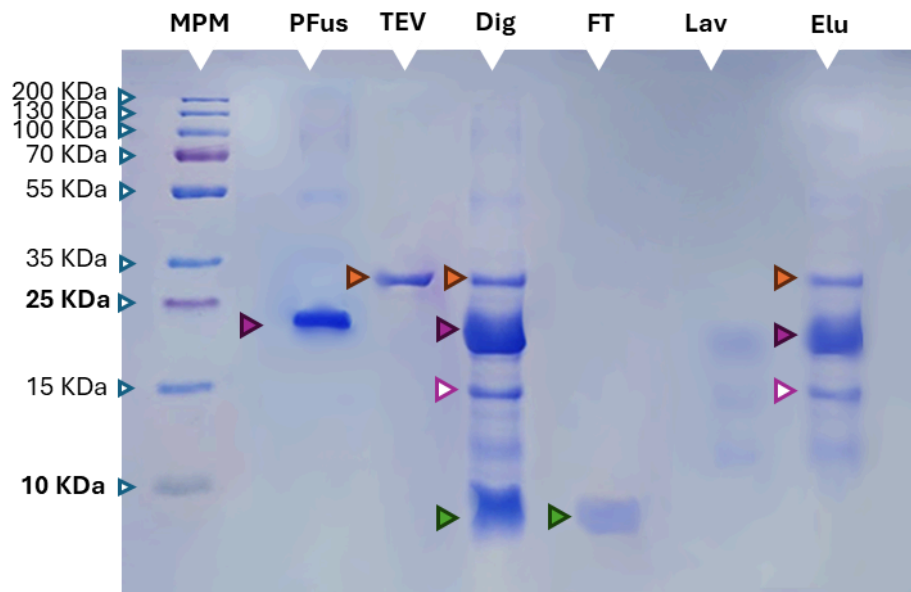


Figura 19: Digestión de PFus y purificación de la Jerdo-Ec. SDS-PAGE en gel de acrilamida 15%, sembrado con muestras purificadas de **PFus**, de **TEV**, producto de digestión (**Dig**) y las fracciones de la purificación de Jerdo-Ec; percolado (**FT**), lavado (**Lav**) y eluido (**Elu**). **MPM** indica el carril donde fue sembrado el marcador de peso molecular. Referencias de color: PFus; **morada**, TEV; **anaranjada**, Pfus sin jerdostatina; **blanca**, Jerdo-Ec; **verde**.

Para corroborar la identidad de la banda visualizada en **Elu** (flecha verde, <10 kDa), se llevó a cabo un análisis por espectrometría de masas. Los resultados del ensayo (**Figura 20**), indicaron que la proteína de la banda analizada se compone de 44 aminoácidos y un peso molecular de 4654 kDa, con una cobertura del 72,7 %, confirmando la identidad de la proteína obtenida.



Figura 20: Análisis de Jerdo-Ec por espectrometría de masas. A) Se indica el número de aminoácidos (**length**) y peso molecular (**MolWt**), de la proteína. **SpectrumCount** es un indicador de la abundancia de la proteína. **B)** Comparación de la secuencia de la banda analizada (Jerdo-Ec) con la secuencia reportada de la jerdostatina. En azul se indican los residuos identificados en la muestra.

4.2 Producción recombinante de jerdostatina en sistema heterólogo eucariota

Al proponernos estudiar el efecto de la jerdostatina en células del sistema inmune, se exploró la posibilidad de expresar la proteína en un sistema eucariota. Esto permitiría generar un producto que no requiera de la purificación adicional de endotoxinas bacterianas o el uso de reactivos que neutralicen su efecto, pero además favorecer la formación de los enlaces disulfuro de la jerdostatina con una mayor fidelidad. Por esta razón, se realizó la transfección de células S2 con el plásmido pDro-Ext/Jerdos (Jerdo-Dm).

Se descongeló un criovial de células S2 adaptadas para crecer en medio sin suero fetal y se las cultivó y expandió en medio Insect-XPRESS suplementado con antibióticos. Las células que se mantuvieron a 28 °C hasta que alcanzaron una densidad de 1×10^8 cél/mL, fueron co-transfectadas por electroporación con los plásmidos pDro-Ext/Jerdos y pCoPuro. La selección de las células transfectadas se realizó con el agregado de puomicina al medio de cultivo, ya que el plásmido pCoPuro confiere resistencia a dicho antibiótico. Pasadas las 72 h, se indujo la expresión de Jerdo-Dm con 5 μ M de CdCl₂. Las células se mantuvieron por una semana y se recogieron periódicamente muestras del medio de cultivo.

En la **Figura 21** se muestra el resultado del análisis de la proteína inducida por *western blot* para evaluar la expresión de Jerdo-Dm en el medio de cultivo. En los carriles **1** al **4** se sembraron las muestras tomadas a las 24, 48, 96 y 168 h luego de la inducción del cultivo. Conjuntamente, se sembró una muestra de la proteína *Env* del virus de la leucemia bovina, a modo de control positivo, que se visualizó como una banda de ~21 kDa en el carril **Ctrl** y también sobrenadante de células no transfectadas (**nT**) como control negativo. Para los

carriles 1 a 4, donde se sembró el sobrenadante de cultivo de las células transfectadas, se visualizó una banda muy tenue a una altura menor a 10 kDa, cuya intensidad aumenta progresivamente a partir del **carril 2** (48 h post-inducción). Estos resultados indicaron la presencia de Jerdo-Dm en pequeñas cantidades en el sobrenadante de cultivo. Cabe destacar que, en este punto, decidimos realizar un *western blot* y no una SDS-PAGE con el fin de confirmar la presencia de la proteína en la muestra de cultivo utilizando un anticuerpo específico contra el Strep-tag.

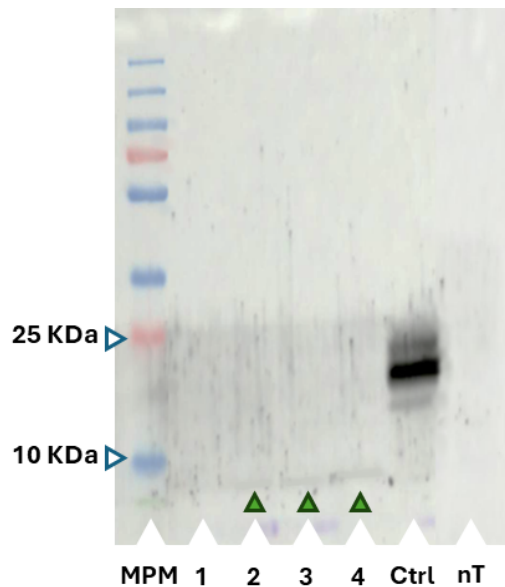


Figura 21: Producción recombinante de Jerdo-Dm en un sistema heterólogo eucariota.

Western blot de los sobrenadantes del medio de cultivo de células S2 transfectadas con el plásmido pDro-Ext/Jerdos. La expresión se indujo con 5 μ M CdCl₂. Carriles: **MPM**: marcador de peso molecular, **Ctrl**: Proteína utilizada como control positivo, **nT**: Sobrenadante de células no transfectadas como control negativo. **1, 2, 3 y 4**, corresponden a muestras de los sobrenadantes de las S2 transfectadas, recolectados a las 24, 48, 96 y 168 h, respectivamente.

Debido a la baja intensidad de las bandas obtenidas correspondientes a Jerdo-Dm, se decidió concentrar una fracción (1000 μ L) del sobrenadante del cultivo que se tomó a las 168 h. Para ello se utilizaron las *beads* magnéticas MagStrep® Strep-Tactin®XT, siguiendo el protocolo del fabricante, obteniendo 50 μ L de concentrado. Para observar los resultados de la concentración y si esto mejoraba la señal respecto a la muestra sin concentrar, se realizó un *Dot blot*, principalmente porque es más rápido que el *Western blot* y al emplear los mismos anticuerpos, la señal permitiría indicar la presencia del Strep-tag, y en consecuencia, de Jerdo-Dm. En una membrana de nitrocelulosa se sembraron las mismas muestras analizadas en el *Western blot*, junto con la muestra concentrada, como se

muestra en la **Figura 22**.

El revelado del *Dot blot* permitió visualizar señal en los carriles **Ctrl**, **4** y **5**. A pesar de que la señal más intensa fue la del control positivo, la muestra concentrada ofreció mejor visualización que la muestra sin concentrar.

Debido al bajo rendimiento en la producción de Jerdo-Dm que se deduce de la baja señal obtenida tanto en el *western blot*, como en el *dot blot*, se decidió utilizar exclusivamente Jerdo-Ec para realizar ensayos posteriores.

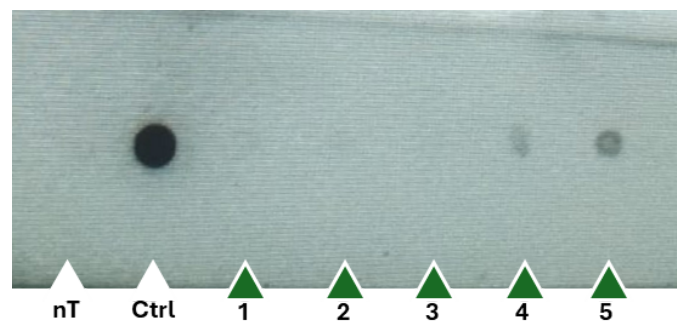


Figura 22: Identificación de Jerdo-Dm en medio de cultivo por dot blot. Se sembraron los sobrenadantes de células sin transfectar (nT) y células transfectadas (Ctrl) a modo de controles negativo y positivo, respectivamente. **Carril 1:** 24 h, **Carril 2:** 48 h, **Carril 3:** 96 h, **Carril 4:** 168 h, **Carril 5:** concentrado 20 veces de 168 h.

4.3 Producción recombinante de integrina $\alpha 1\beta 1$

Como se indicó previamente en la Introducción, la jerdostatina es una desintegrina que reconoce de forma específica a la integrina $\alpha 1\beta 1$. Por lo tanto, para analizar la Jerdo-Ec recombinante, fue necesario evaluar su interacción con esta proteína. Para ello se produjo y purificó la integrina $\alpha 1\beta 1$, en el marco de una pasantía en el laboratorio del Prof. Johannes Eble.

La purificación se realizó por IMAC a partir del medio de cultivo de células S2 ya transfectadas, que expresan el ectodominio de las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 1$ de la integrina (**Figura 15**). Las células se cultivaron y expandieron a 28 °C hasta alcanzar la densidad adecuada para su inducción con CuSO_4 . Pasados cinco días de la inducción, se recogió la suspensión celular, se filtró y se cargó en una columna pre-empaquetada con una resina unida al fragmento CB3 del colágeno IV, ya que es la región de la molécula a la que se une la integrina $\alpha 1\beta 1$.

La purificación se analizó por medio de SDS-PAGE en condiciones reductoras en un gel en gradiente del 7 al 12% de acrilamida (**Figura 23**). En el carril correspondiente al percolado (**FT**) se observaron numerosas bandas que migraron a diferente altura, algunas de las cuales también se visualizaron con menor intensidad en el lavado (**Lav**). En el carril donde fue sembrado el eluido, se distinguieron dos bandas, una de ~150 kDa (señalada en violeta) y otra de ~100 kDa (indicada en rojo), cuyas alturas corresponden a las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 1$, respectivamente. Esto se debe a que en condiciones reductoras, el ectodominio de la integrina $\alpha 1\beta 1$ recombinante, se separa, rompiendo la unión de los motivos de dimerización Fos y Jun, por lo que las subunidades $\alpha 1$ -Fos (~140 kDa) y $\beta 1$ -Jun (~100 kDa) migran de forma independiente⁸⁹, como se muestra en la **Figura 15 B**.

Como una forma adicional para confirmar la identidad de la proteína purificada, se realizó un ensayo de *western blot* utilizando un anticuerpo policlonal específico de la subunidad $\beta 1$ (**Figura 23B**). En el carril **Ctrl** se sembró una muestra de la integrina $\alpha 1\beta 1$ previamente purificada, cedida por el Prof. Eble, como control positivo junto con la fracción purificada (**Elu**). Ambas muestras, visualizadas como un componente de peso molecular aparente de 90 kDa, fueron reconocidas por el anticuerpo, lo que confirma la presencia de la subunidad $\beta 1$ en la proteína purificada.

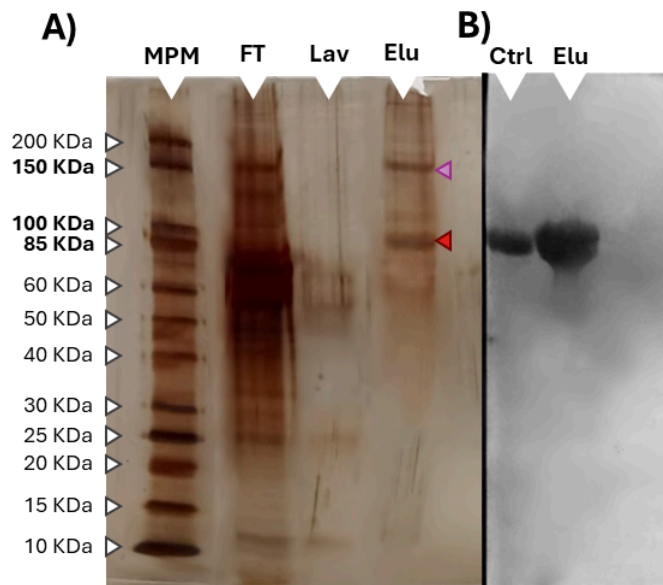


Figura 23: Purificación del heterodominio soluble de la integrina $\alpha1\beta1$. **A)** Producción del ectodominio a partir de la inducción de células S2 previamente transfectadas. Luego de su inducción con CuSO_4 , las células secretan de forma independiente el ectodominio de las subunidades $\alpha1$ y $\beta1$. Las muestras fueron sembradas en un gel de acrilamida en gradiente (del 7% al 12%), que posteriormente se tiñó con tinción de nitrato de plata. **Carriles:** Percolado (**FT**), lavado (**Lav**) y Eluido (**Elu**) que contiene las subunidades del ectodominio soluble, y el marcador de peso molecular (**MPM**). En **violeta** se señala la subunidad $\alpha1$ y en **rojo** la subunidad $\beta1$. **B)** Western blot de la fracción purificada de integrina $\alpha1\beta1$ (**Elu**), junto a una muestra de una purificación previa de la integrina utilizada como control positivo (**Ctrl**). La detección del western blot se realizó con un anticuerpo específico dirigido contra la subunidad $\beta1$.

4.4 Ensayos de interacción

Las proteínas recombinantes fueron evaluadas con el fin de analizar su capacidad de interactuar con sus ligandos. La unión entre la integrina $\alpha 1\beta 1$ y el colágeno tipo IV se da por la interacción del dominio α -I de la integrina, con el fragmento CB3 del colágeno, donde los dominios triple hélice se encuentran estabilizados por puentes disulfuro intercatenarios próximo a los dominios no globulares (NC1) (**Figura 24 A**).

Por otro lado, la jerdostatina se une a la integrina $\alpha 1\beta 1$ por medio de su motivo de unión RTS. Sin embargo, los resultados publicados por Bolás *et al.* (2014) indican que la desintegrina no interactúa con el dominio I de la subunidad $\alpha 1$ aislada. Por lo tanto, el mecanismo inhibitorio se desconoce y podría deberse tanto a un efecto alostérico, o a la necesidad de que el heterodímero esté formado para dar lugar a un sitio de reconocimiento al que se une la jerdostatina (**Figura 24 B**).

Como se mencionó anteriormente en el apartado 9 de *Materiales y Métodos*, se realizaron ensayos de tipo ELISA, detectando la presencia de la integrina con un anticuerpo específico contra la subunidad $\beta 1$.

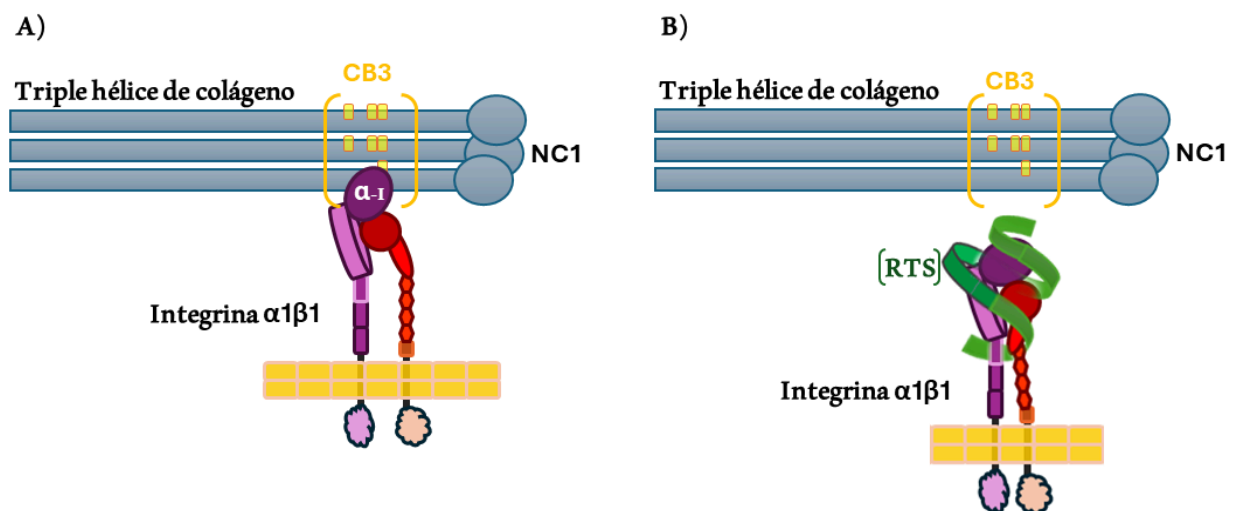


Figura 24: Esquema de la interacción entre la integrina $\alpha 1\beta 1$ y su ligando. A) Unión entre el dominio α -I de la integrina y el fragmento CB3 de la triple hélice de colágeno, que se ensambla en el dominio NC1. La subunidad $\alpha 1$ se representa en morado y en rojo la subunidad $\beta 1$. **B)** La unión de la jerdostatina a la integrina $\alpha 1\beta 1$ bloquea la interacción entre esta última y el colágeno. Como se desconoce el sitio de unión exacto de la jerdostatina a la integrina, aquí se ejemplifica con la integrina en una conformación extendida pero cerrada, solo con fines ilustrativos. Entre corchetes amarillos se señala el fragmento CB3 (indicando con bloques amarillos los residuos de cisteína). El motivo de unión RTS de la jerdostatina se muestra en color verde oscuro. Adaptado de Boudko (2023) ⁴².

4.4.1 Unión de integrina $\alpha 1\beta 1$ al colágeno y CB3

El primer ensayo se realizó para determinar si la integrina recombinante era capaz de unirse al colágeno puro y al fragmento CB3 aislado. Se incubó la integrina en pocillos previamente sensibilizados con el colágeno o con el fragmento CB3, como se muestra en la **Figura 25**.

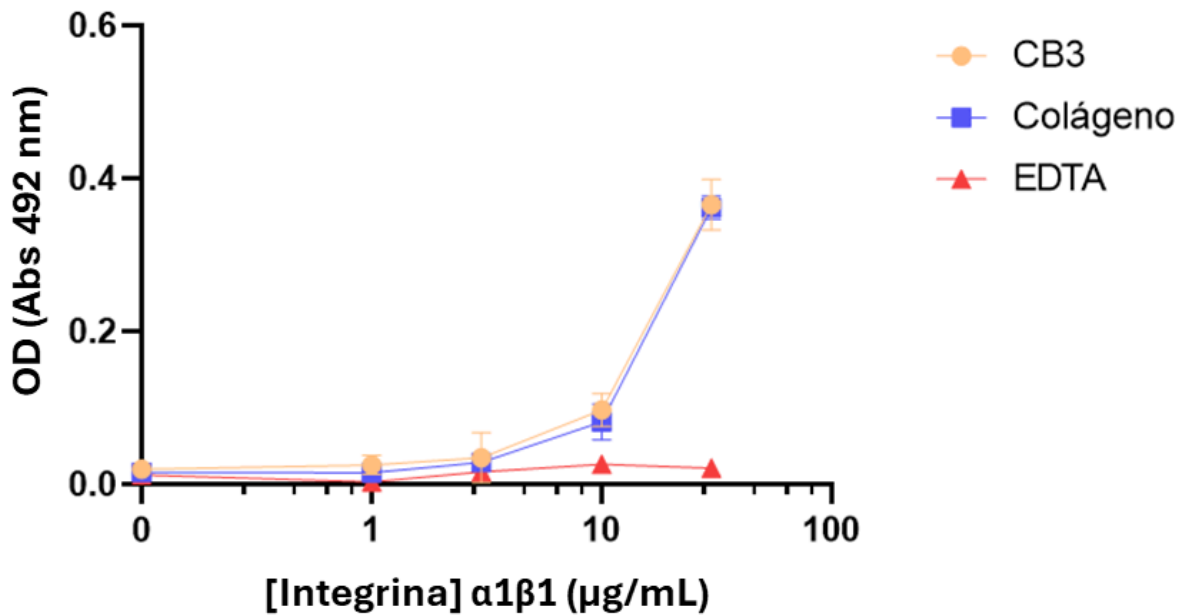


Figura 25: Evaluación de la unión de integrina $\alpha 1\beta 1$ a colágeno y CB3 por ELISA. Se sensibilizaron placas de 96 pocillos con 10 $\mu\text{g/mL}$ de colágeno o 5 $\mu\text{g/mL}$ de CB3, que posteriormente se incubaron con concentraciones crecientes de integrina $\alpha 1\beta 1$ soluble. Como control, se utilizó EDTA 10 mM. La detección se efectuó utilizando un anticuerpo específico conjugado a una peroxidasa. Los resultados se expresan como densidad óptica a 492 nm y son el resultado de la media \pm desvío estándar (SD) de tres experimentos independientes.

Como se observa en la **Figura 25**, la absorbancia aumenta de forma proporcional con el incremento de la concentración de integrina al ser incubada con colágeno o CB3. Esto se debe a que la interacción entre la integrina $\alpha 1\beta 1$ y su ligando es dosis dependiente. Sin embargo, cuando se agrega EDTA, la misma no aumenta a pesar de que lo haga la concentración de integrina $\alpha 1\beta 1$. El EDTA secuestra los cationes divalentes necesarios para la interacción entre el dominio I de la subunidad $\alpha 1$ y el fragmento CB3 del colágeno (ya sea en el colágeno puro o el fragmento aislado), siendo una condición apropiada como control negativo.

4.4.2 Unión de jerdostatina a la integrina $\alpha 1\beta 1$

Luego de comprobar que la integrina recombinante se une al colágeno, se analizó la interacción entre dicha proteína con Jerdo-Ec, para evaluar que esta última se une a su ligando específico. Para ello, se inmovilizó Jerdo-Ec en una placa y se incubó con diferentes concentraciones de la integrina $\alpha 1\beta 1$ recombinante.

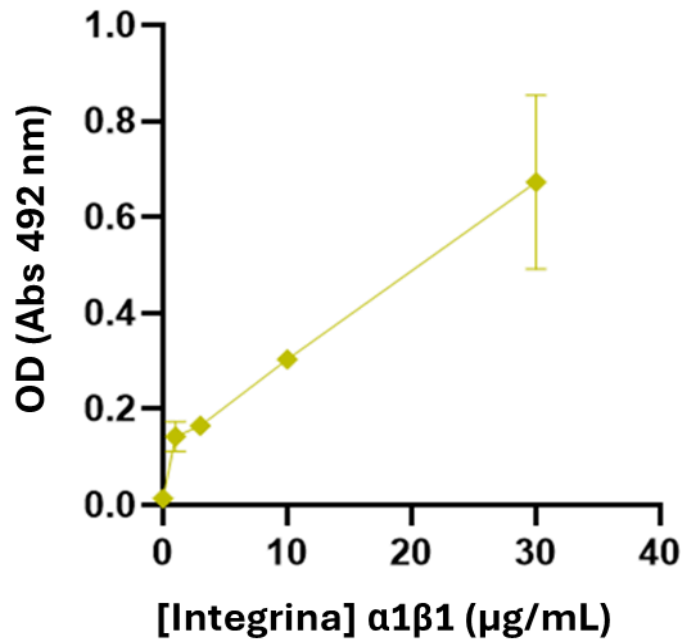


Figura 26: Interacción entre Jerdo-Ec y la integrina $\alpha 1\beta 1$ evaluado por ELISA. En un placa de 96 pocillos se inmovilizaron 10 $\mu\text{g/mL}$ de Jerdo-Ec y luego se incubó con concentraciones crecientes de integrina $\alpha 1\beta 1$ recombinante. Se detectó con un anticuerpo específico conjugado a peroxidasa. Los resultados se expresan como densidad óptica a 492 nm y son el resultado de la media \pm SD de tres experimentos independientes.

Los resultados en la **Figura 26** indican que la unión entre Jerdo-Ec y la integrina $\alpha 1\beta 1$ es de carácter dosis-dependiente, puesto que a mayor concentración de desintegrina, aumenta la absorbancia de forma proporcional. En base a estos resultados, podemos asegurar que la jerdostatina recombinante reconoce y se une a la integrina, lo que permite que esta última sea detectada por el anticuerpo contra la subunidad $\beta 1$. Si no hubiese interacción entre Jerdo-Ec y la integrina $\alpha 1\beta 1$, esta última sería removida durante los lavados del ELISA, imposibilitando su detección.

4.4.3 Inhibición de unión integrina - colágeno por Jerdo-Ec

La jerdostatina tiene como función bloquear la unión entre la integrina $\alpha 1\beta 1$ y el colágeno, por lo que luego de probar que Jerdo-Ec es capaz de unirse a la integrina, se evaluó su capacidad de bloquear la interacción entre esta última y el colágeno mediante un ensayo tipo ELISA de inhibición. Se pre-incubó la integrina $\alpha 1\beta 1$ (a dos concentraciones diferentes) con 0, 2.5, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Jerdo-Ec, que luego se sembraron en una placa previamente sensibilizada con CB3. El gráfico de la **Figura 27** muestra los resultados de los ensayos por duplicado para ambas concentraciones de integrina (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en fucsia y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en púrpura). En ambos casos, se observó un aumento de la absorbancia en función del incremento de la concentración de Jerdo-Ec, siendo más pronunciado para la mayor concentración de la integrina soluble (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Este resultado no fue el esperado, debido a que la presencia de Jerdo-Ec debería disminuir la señal del revelado, ya que la jerdostatina bloquea la interacción entre la integrina $\alpha 1\beta 1$ y el colágeno.

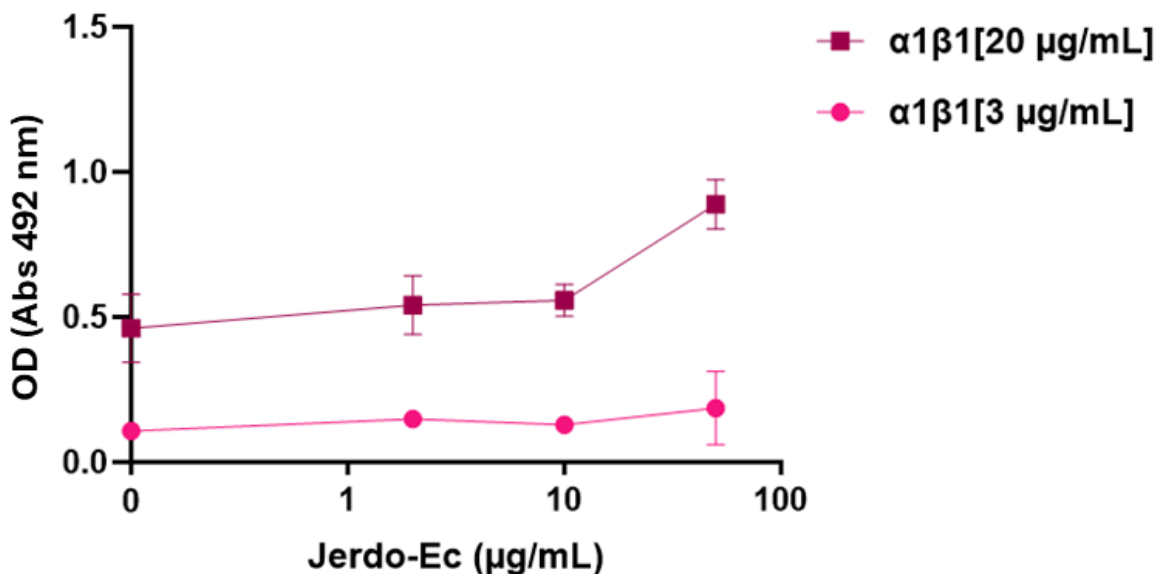


Figura 27. Ensayo de inhibición de la unión entre la integrina $\alpha 1\beta 1$ y el colágeno por Jerdo-Ec. Se pre-incubaron diferentes concentraciones de Jerdo-Ec (0, 2, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), con dos concentraciones de integrina $\alpha 1\beta 1$ soluble; 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (púrpura) y 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (fucsia), durante 1 h a 37 $^{\circ}\text{C}$, que luego se sembraron en pocillos previamente sensibilizados con colágeno o CB3. La detección se realizó por medio de un anticuerpo específico unido a una peroxidasa y se midió la absorbancia a 492 nm. Los resultados son producto de la media \pm desvío estándar (SD) de tres experimentos independientes.

4.5 Análisis de las propiedades inmunomoduladoras de Jerdo-Ec sobre DC

4.5.1 Maduración y activación de DC

Las DC cumplen un rol fundamental en el organismo, siendo las encargadas de generar el nexo entre la inmunidad innata y la adaptativa, dirigiendo así la respuesta inmune. Para sus funciones, las DC cuentan con diversos receptores, como los TLRs, conservados evolutivamente para reconocer PAMPs.

Hasta el momento, no hay estudios que vinculen a la jerdostatina con células del sistema inmune, razón por la cual nos propusimos a evaluar sus efectos sobre la maduración y activación de las DC en presencia de la desintegrina. Este procedimiento se llevó a cabo en presencia y ausencia de polimixina B, un péptido catiónico que une y neutraliza la toxicidad de las endotoxinas, a través de su interacción con LPS de bacterias Gram negativas. De esta forma se puede detectar el efecto de las endotoxinas bacterianas en la respuesta evaluada. Posteriormente, se analizaron moléculas de superficie por citometría de flujo y la secreción de dos citoquinas del sobrenadante. En la Tabla 6 se muestran los ligandos, los TLR que activan y su ubicación celular.

Tabla 6: Ligandos de TLRs utilizados para los ensayos de maduración en DC.

TLR	TLR2/TLR1	TLR3	TLR2	TLR7 (ratones)
Ubicación del receptor	Membrana celular	Endosomal	Membrana celular	Endosomales
Ligando utilizado	PAM3CSK4 (PAM)	Poly:IC (PIC)	Zimosan (Zimo)	R848
Naturaleza del ligando	Lipopéptido bacteriano (sintético)	ARN bicatenario (sintético)	Preparado de pared celular de levadura	Imidazoquinolina (sintético)

4.5.2 Evaluación de la expresión de moléculas de coestimulación

Se comenzó con el *gating* de las poblaciones celulares para seleccionar las DC, basándonos primeramente en aspectos de granulosidad y tamaño y la expresión de CD11c^{hi}, como se indica en la **Figura 28**.

Una vez definida la población celular, se prosiguió con el análisis de la expresión de las moléculas de co-estimulación CD40 y CD86 y se complementó con la expresión del MHC de clase II (**Figura 29**). Ello se llevó a cabo a través de la cuantificación de las células positivas para dichas moléculas y de la intensidad de fluorescencia de las células CD11c⁺. En primera instancia se analizaron los efectos de PIC y Zimo con diferentes concentraciones de Jerdo-Ec, en presencia o ausencia de polimixina B. Como los ensayos se llevaron a cabo utilizando jerdostatina recombinante producida en *E. coli*, se evaluó la posible presencia de endotoxinas que pudiesen enmascarar el efecto producido por Jerdo-Ec en las DC, incorporando polimixina B. El resultado de estos ensayos se muestra en la **Figura 29**, cómo índice de fluorescencia media (MFI) en función de concentración de Jerdo-Ec en mg/mL, sin polimixina B y con el agregado de la misma.

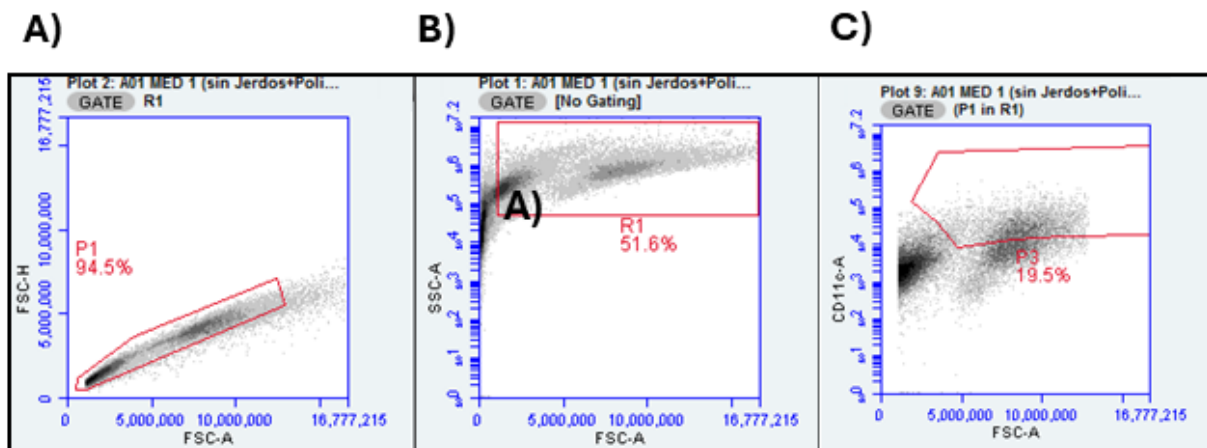


Figura 28: Estrategia de gating de citometría de flujo de las BMDC. BMDC seleccionadas en función de su tamaño (FSC) (A), la complejidad interna (SSC) (B) y la expresión del marcador de superficie CD11c^{hi} (C). En los recuadros rojos se indica la población celular seleccionada y el porcentaje que estas representan en la población total.

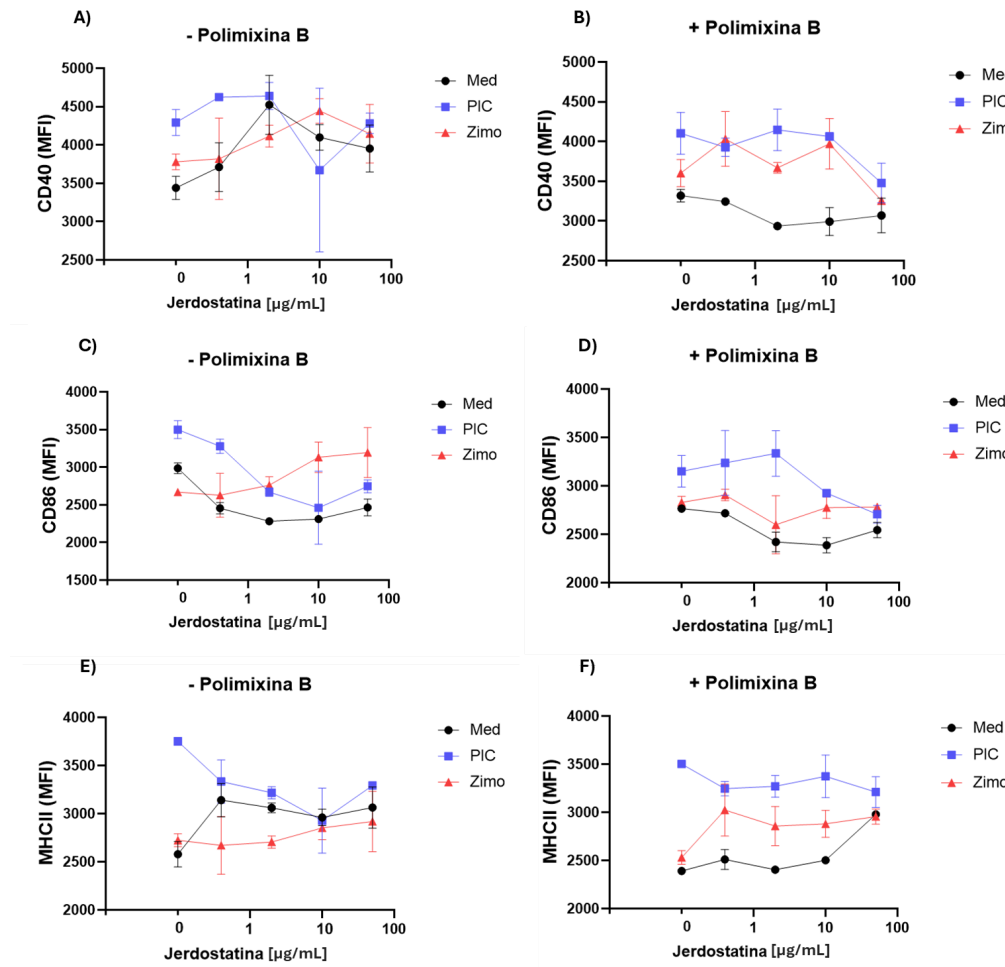


Figura 29: Análisis de la maduración de DC a través de la expresión de moléculas de co-estimulación y MHCII. Se incubaron DC con concentraciones crecientes de Jerdo-Ec (0.1, 0.4, 2, 10 y 50 µg/mL) y se analizó la expresión de moléculas de coestimulación como CD40 (A y B), CD86 (C y D) y la molécula MHC II (E y F) al ser estimuladas con PIC (azul) y Zimo (rojo). Med (negro) representa las DC que no fueron estimuladas con ligandos de TLR. Los gráficos a la izquierda muestran los resultados sin el agregado de polimixina B (-) y a la derecha están los que corresponden a las células que sí fueron incubadas con polimixina B (+).

Como se puede apreciar en la **Figura 29**, Jerdo-Ec en ausencia de polimixina B, la Jerdo-Ec provocó un aumento de CD40 y MHCII, mientras que este efecto fue abolido al neutralizar el LPS con polimixina B, indicando la presencia de endotoxinas en las alícuotas de Jerdo-Ec. Esto es notablemente más visible al observar los gráficos de CD40 y MHC II, especialmente en DC que no fueron expuestas a ningún ligando de TLR. Debido a que la diferencia más evidente se observó para la mayor concentración de Jerdo-Ec, se elaboraron los siguientes gráficos de columna para visualizar la variación del MFI entre los grupos que no fueron

tratados con la desintegrina y los que sí se trataron, ambos casos en presencia de polimixina B (**Figura 30**).

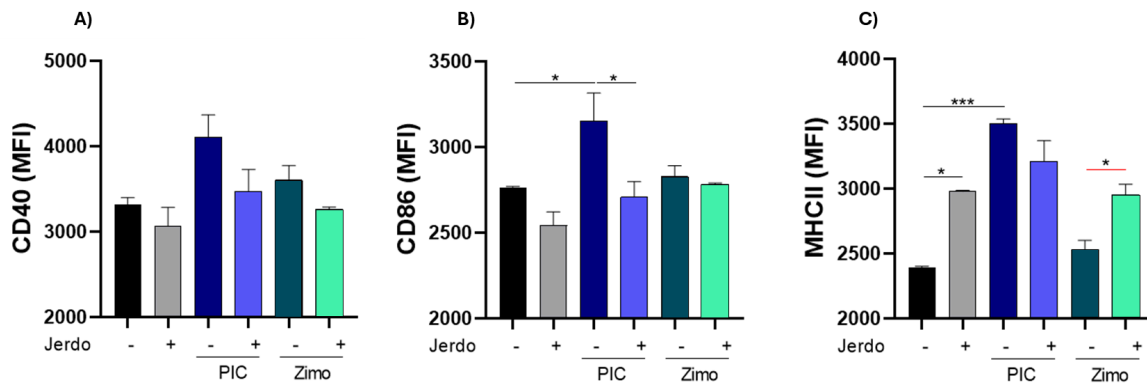


Figura 30: Expresión de moléculas de coestimulación y MHCII en DC estimuladas con jerdostatina y ligandos de TLR en presencia de polimixina B. Las células que no fueron expuestas a ligandos de TLR se muestran en negro y gris. Las DC incubadas con PIC (**azul**) y Zimo (**verde**), fueron tratadas con 50 µg/mL de Jerdo-Ec. Todas las células fueron tratadas con polimixina B. La ausencia o presencia de la desintegrina se indica con los signos - y +. Se indica con asteriscos (*) la significancia estadística entre los resultados, siendo $p^* < 0.05$ y $p^{***} < 0.001$ (One-way ANOVA). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism versión 8.0.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA.)

En base a estos resultados, podemos concluir que la expresión de CD40 no varía de forma significativa independientemente del ligando utilizado o la presencia de Jerdo-Ec. Al analizar CD86, vemos que PIC induce un aumento de su expresión, pero que este aumento es inhibido por la jerdostatina. Finalmente, PIC provoca un incremento de la expresión de MHC II, mientras que Jerdo-Ec favorece su expresión cuando las DC no se tratan con ligandos de TLR o cuando son estimuladas por Zimo.

A partir de estas observaciones, se resolvió realizar nuevos ensayos de estimulación de BMDCs únicamente con 50 µg/mL de Jerdo-Ec y con polimixina B en todos los casos. Además, se incorporaron otros ligandos de TLR, como el PAM (TLR1/2) y R848 (TLR 7). Los resultados de estos ensayos se presentan en la **Figura 31**, en donde se observa que la expresión de CD40 en las células CD11c⁺, así como la presencia de células CD11c⁺, CD40⁺ fue potenciada por los ligandos Zimo y R848 de forma significativa. Al agregar Jerdo-Ec, la expresión de CD40 inducida por Zimo y R848 se vio inhibida, disminuyendo notablemente respecto a la expresión en ausencia de esta desintegrina. Para el caso de PAM y PIC no se registraron cambios significativos en la expresión de CD40, ni en el número de células que

la expresan, independientemente de que se hayan tratado o no con Jerdo-Ec. No obstante, y aunque no fue significativo, las DC estimuladas con PIC parecerían mostrar una tendencia a disminuir, respecto a PAM, si observamos el porcentaje de células positivas (**Figura 31**).

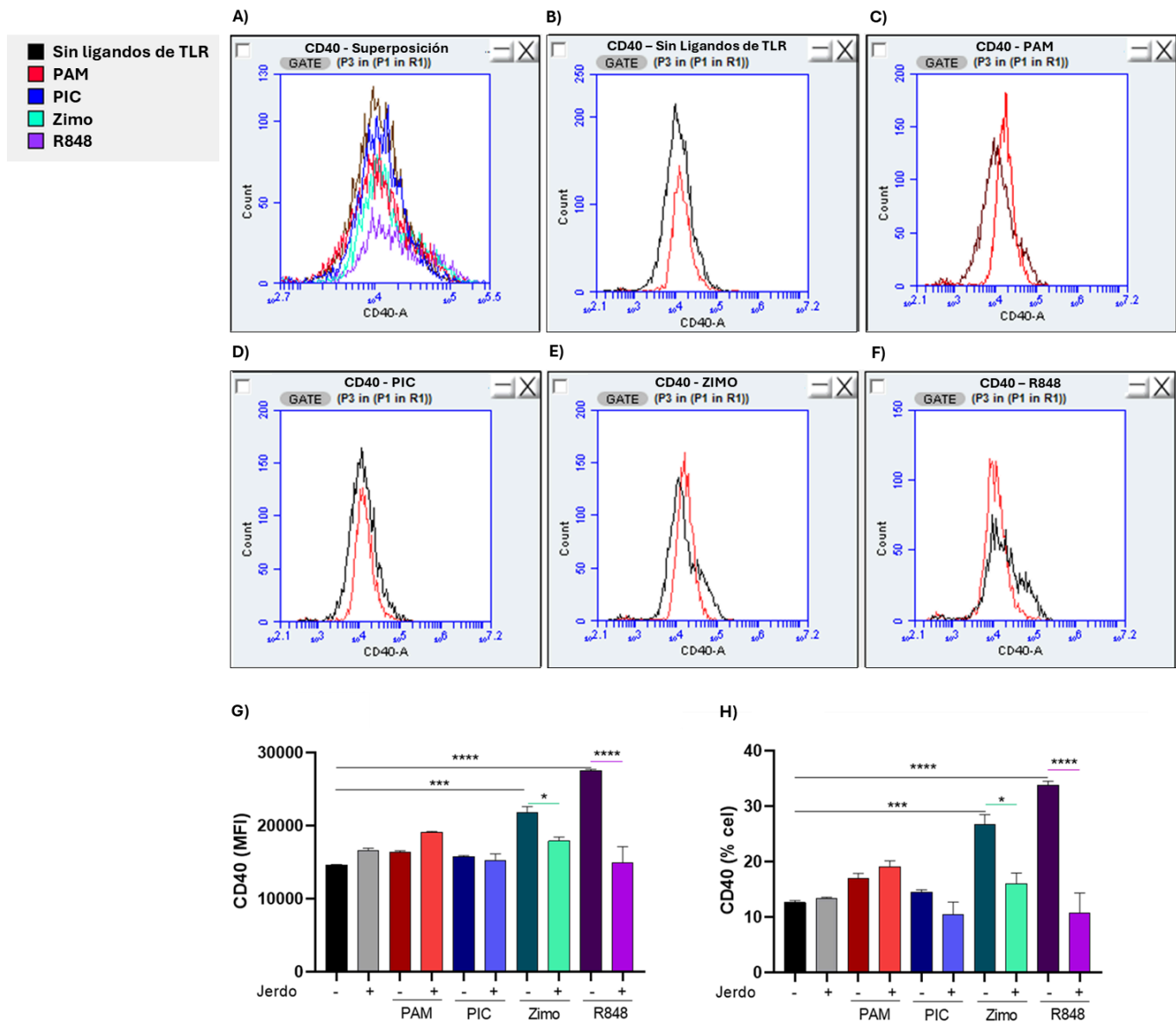


Figura 31: Expresión de CD40 en BMDC tratadas con ligandos de TLR. El Panel A muestra la superposición de los histogramas de las células sin tratar y tratadas con ligandos de TLR. Sin tratar (**negro**) y las tratadas con PAM (**rojo**), PIC (**azul**), Zimo (**verde**) y R848 (**morado**) sin el agregado de Jerdo-Ec. En los paneles B-F se comparan los histogramas de las células que expresan CD40 en ausencia (**negro**) o presencia (**rojo**) de Jerdo-Ec. Índice de fluorescencia media (G) y porcentaje de células (H) CD11c⁺ que expresan el receptor CD40. Las células fueron tratadas con y sin Jerdo-Ec (+ o -, respectivamente) durante 2 h y luego se incubaron 18 h con los ligandos de TLR. Finalmente se marcaron con anticuerpos fluorescentes específicos y se analizaron por citometría flujo. Se indica con asteriscos (*) la significancia estadística entre los resultados, siendo $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.01$ y $p^{****} < 0.0001$ (One-way ANOVA). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism versión 8.0.2.

Por otro lado, la expresión de CD86 fue potenciada por los ligandos PAM3CSK4 y Zimosán (**Figura 32**), siendo mayor el efecto inducido por Zimo. Este resultado es esperado, debido a que estas moléculas (agonistas de TLR2) son análogos o derivados de componentes presentes en la superficie de patógenos extracelulares, por lo que son reconocidos por receptores que se encuentran en la membrana celular de las DC. En presencia de jerдостatina recombinante, la expresión de CD86 inducida por los ligandos de TLR utilizados disminuyó en todos los casos.

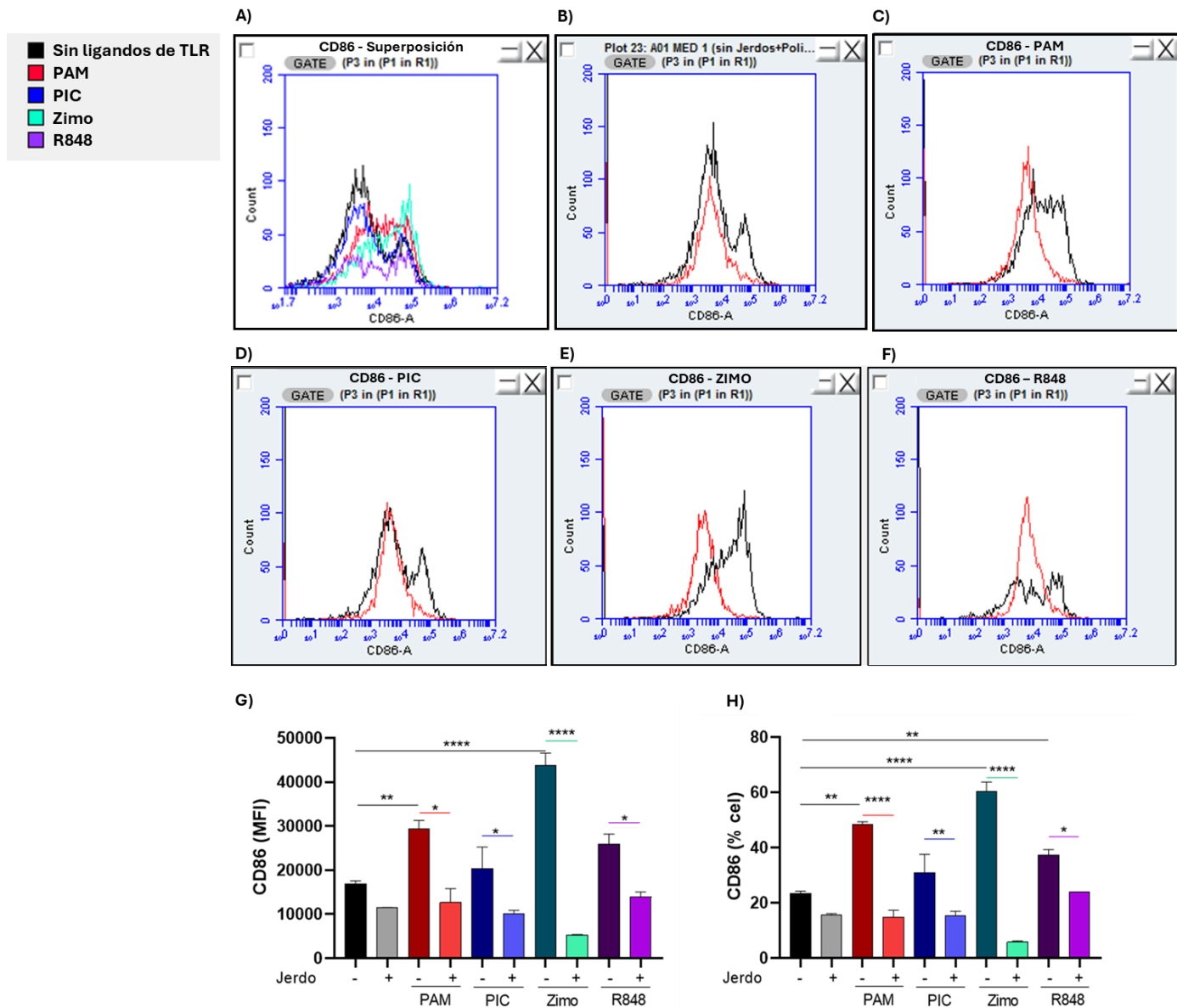


Figura 32: Expresión de CD86 en BMDC tratadas con ligandos de TLR. **A)** Superposición de los histogramas de las células sin tratar con ligandos de TLR (**negro**) y las tratadas con PAM (**rojo**), PIC (**azul**), Zimo (**verde**) y R848 (**morado**) sin el agregado de Jerdo-Ec. En los paneles **B-F** se compara el conteo de células que expresan CD86 en ausencia (**negro**) o presencia (**rojo**) de Jerdo-Ec. Índice de fluorescencia media de CD86 (**G**) y porcentaje de células CD11c⁺ que expresan CD86 (**H**). La detección se realizó por citometría de flujo usando anticuerpos fluorescentes específicos contra las moléculas de superficie. Las muestras se prepararon en dos condiciones; presencia (+) o ausencia (-) de Jerdo-Ec y luego se incubaron con PAM, PIC, Zimo o R848. La significancia estadística (p-valor <0,0001) entre los resultados se indica mediante asteriscos (*), siendo p* <0,05, p** <0,01, p*** <0,001 y p**** <0,0001. Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza de una vía (One-way ANOVA), seguido de la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism versión 8.0.2.

■ Sin ligandos de TLR
 ■ PAM
 ■ PIC
 ■ Zimo
 ■ R848

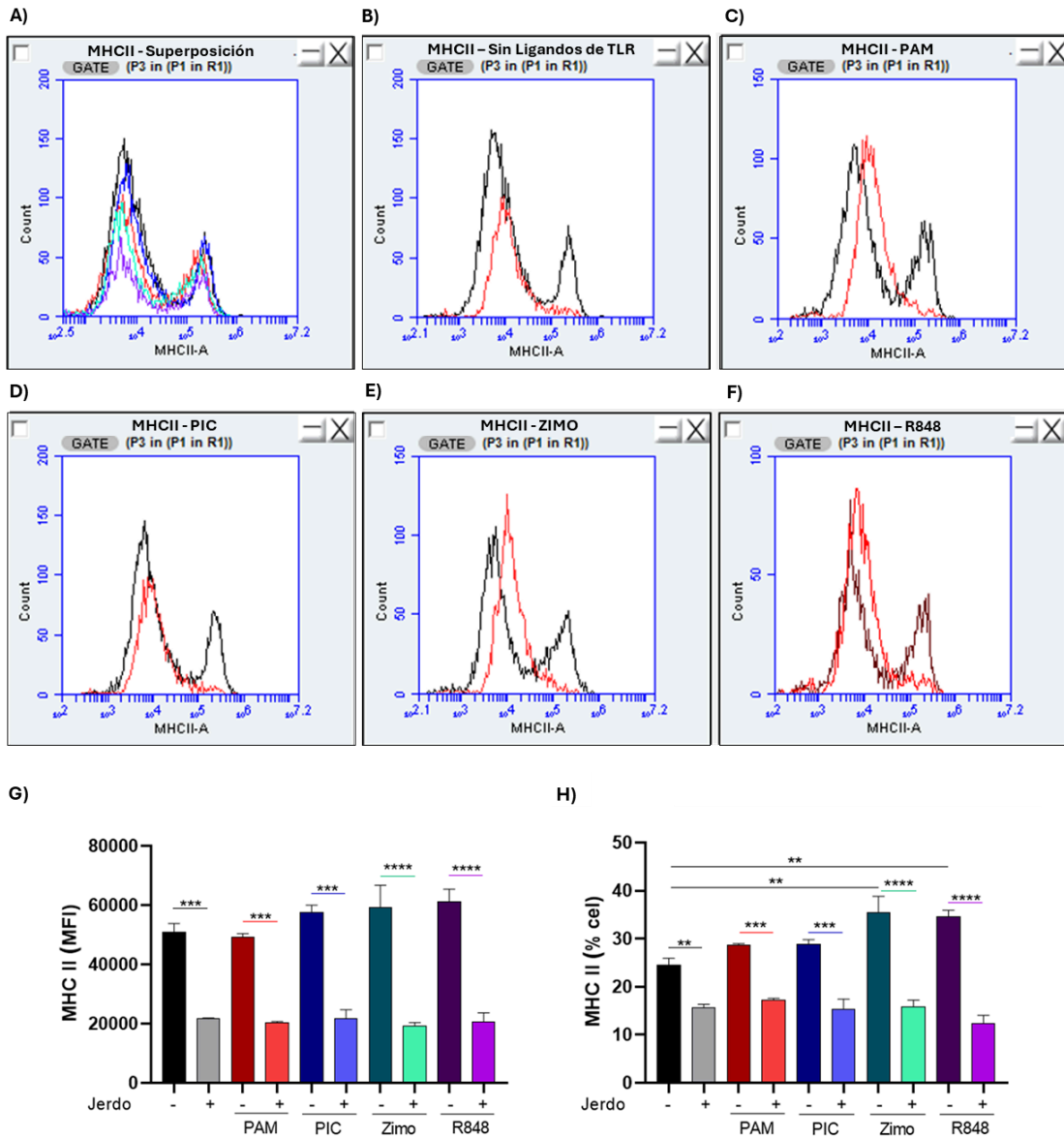


Figura 33: Expresión de MHC II en BMDC estimuladas con diferentes agonistas de TLR. A) Superposición de los histogramas de las células sin tratar con ligandos de TLR (**negro**) y las tratadas con PAM (**rojo**), PIC (**azul**), Zimo (**verde**) y R848 (**morado**) sin el agregado de Jerdo-Ec. En los paneles **B-F** se compara el conteo de células que expresan CD86 en ausencia (**negro**) o presencia (**rojo**) de Jerdo-Ec. **G)** Gráfico del Índice de fluorescencia media (**MFI**) de la expresión del MHC II. **H)** Porcentaje de células (**%cel**) CD11c⁺ que expresan el MHC II. La detección del complejo mayor de histocompatibilidad por citometría de flujo, se hizo mediante anticuerpos fluorescentes específicos contra la molécula. Las muestras se incubaron durante 2 h en presencia (+) o ausencia (-) de Jerdo-Ec y luego con PAM, PIC, Zimo o R848. La significancia estadística entre los resultados se indica mediante asteriscos (*). Donde p**<0.01, p***<0.001 y p****<0.0001 Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza de una vía (One-way ANOVA), utilizando GraphPad Prism versión 8.0.2.

Por último, al analizar la expresión de MHC II (**Figura 33**) se observó que el índice de fluorescencia media (**Figura 33 G**) no muestra diferencias significativas, pese a que parecen aumentar los valores de PIC, Zimo y R848. No obstante, al analizar el porcentaje de células CD11c⁺ (**Figura 33 H**), aunque todas las células tratadas con antagonistas de TLR parecen aumentar, solo hay un incremento significativo de las que fueron estimuladas por Zimo y R848. Finalmente, las células CD11c⁺ que fueron previamente tratadas con Jerdo-Ec exhibieron una disminución considerable de la expresión de MHC II para todos los casos, independientemente de la molécula con la que fueron estimuladas. Estos resultados indican que la desintegrina podría tener un efecto inmunomodulador sobre la expresión de esta molécula de superficie.

4.5.3 Evaluación de las citoquinas secretadas por CD maduras

Para complementar los ensayos de expresión de moléculas coestimuladoras y de MHCII, el sobrenadante de cultivo de las BMDC en presencia o ausencia de ligandos de TLR y Jerdo-Ec fue analizado mediante ELISA tipo sandwich para evaluar la expresión de las citoquinas IL-6 e IL-12p70. Las citoquinas son proteínas que actúan como mensajeros que utilizan las células inmunes para comunicarse, habiendo un extenso repertorio de estas, su secreción depende principalmente del contexto inmunológico en el que son sintetizadas^{90,91}. Concretamente IL-6 e IL-12p70 son citoquinas proinflamatorias, y esperamos encontrarlas en el sobrenadante de las DC estimuladas con los ligandos de TLR.

Conjuntamente con la citometría de flujo para analizar la expresión de moléculas de co-estimulación y de MHC II, se evaluó el efecto de la polimixina B en el sobrenadante de las células estimuladas con PIC y Zimo, pre incubadas con jerdostatina, cuyo resultado se observa en la **Figura 35**. Al comparar la expresión de IL-6 sin agregado de polimixina B **Figura 35 (A)** y con polimixina B (**Figura 35 B**) se observaron diferencias en los niveles de citoquinas. Mientras que en **A** no hay diferencias significativas y un nivel de expresión similar, independientemente de la estimulación o no con PIC y Zimo, al agregar polimixina **B** se visualizó un aumento significativo en la producción de IL-6 estimulada por Zimo. A su vez, con el agregado de Jerdo-Ec en presencia de polimixina B, se observó una disminución en los niveles de citoquina producida. Por otro lado, al analizar la producción de IL-12p70 en ausencia de polimixina B (**Figura 35 C**) se observó un aumento en presencia de Zimo, mientras que los niveles de IL-12p70 no cambiaron con PIC. Al agregar Jerdo-Ec se detectó un incremento de esta citoquina en ausencia de ligandos de TLR y en presencia de PIC, pero no con Zimo (**Figura 35 C**). No obstante, en presencia de polimixina B, la producción de IL-12p70 inducida por Zimo disminuyó (**Figura 35 D**). En presencia de Jerdo-Ec, los

niveles de IL-12p70 secretados por las DC que fueron incubadas junto con polimixina B, no sufrieron cambios significativos entre las que no fueron estimuladas con ligandos de TLR, ni en las que fueron estimuladas con PIC. Sin embargo, aquellas que se estimularon con Zimo, mostraron un descenso considerable en la producción de IL-12p70 al ser incubadas junto a Jerdo-Ec, indicando que la desintegrina inhibe la producción de la citoquina.

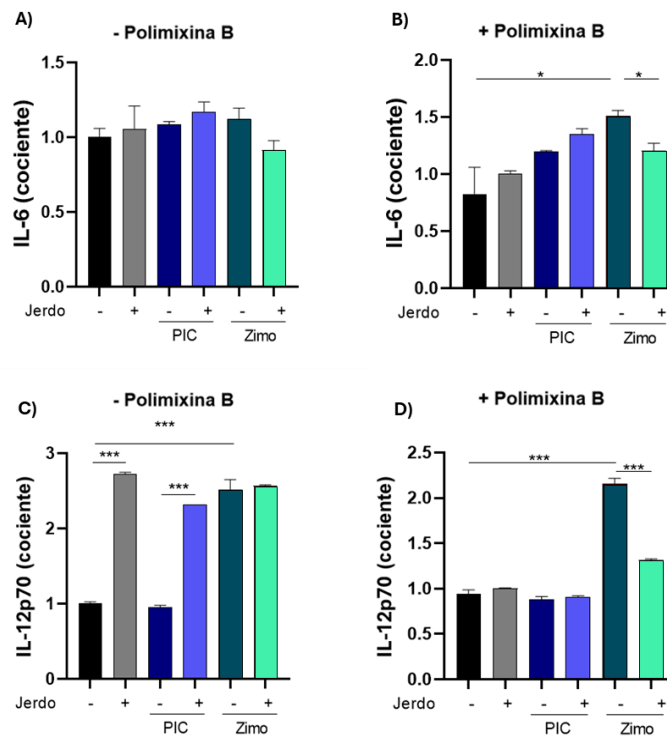


Figura 35: Análisis de la expresión de IL-6 e IL-12p70 por BMDC estimuladas. Las DC se incubaron con Jerdo-Ec y se estimularon con PIC (azul) o Zimo (verde). A y B muestran la expresión de IL-6 en ausencia o presencia de polimixina B, respectivamente. La expresión de IL-12p70 se observa en los gráficos C (polimixina B -) y D (polimixina B +). Los signos de - y + indican ausencia o presencia de Jerdo-Ec. La significancia estadística (p -valor $<0,0001$) entre los resultados se indica mediante asteriscos (*), tal que siendo $p^* < 0.05$ y $p^{***} < 0.001$. Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza de una vía (One-way ANOVA), utilizando GraphPad Prism versión 8.0.2.

Estos resultados indican la necesidad de eliminar el LPS de Jerdo-Ec, o de realizar los ensayos posteriores en presencia de polimixina B, para neutralizar el efecto generado por las endotoxinas. Por lo tanto, los ensayos siguientes se realizaron en presencia de polimixina B y se evaluó el efecto de varios ligandos de TLR.

La **Figura 36** corresponde a los resultados del análisis de la secreción de citoquinas presentes en el medio de cultivo de las DC. Debido a que parte de los valores de DO a 492 nm fueron mayores a los de la curva de calibración y no se disponía de medio de cultivo para repetir el ensayo de ELISA con muestras diluídas, se procedió a analizar los resultados realizando un cociente en relación al control negativo, siendo la condición de las DC incubadas en medio de cultivo en ausencia de estímulos y jerdostatina. Para esto se calculó el promedio de esta condición y dicho valor se utilizó para dividir todos los valores de DO.

En la **Figura 36A** podemos observar que los niveles de secreción de IL-6 disminuyen de forma significativa cuando las DC fueron estimuladas por PIC y por R848. A pesar de que se apreciaron cambios en los niveles de expresión cuando se trataron las DC con PAM y Zimo, estos no fueron significativos.

Se observó que la Jerdo-Ec disminuyó la producción de IL-6 inducida por PAM y en ausencia de ligandos de TLR. No se observaron cambios para el resto de los ligandos de TLR estudiados.

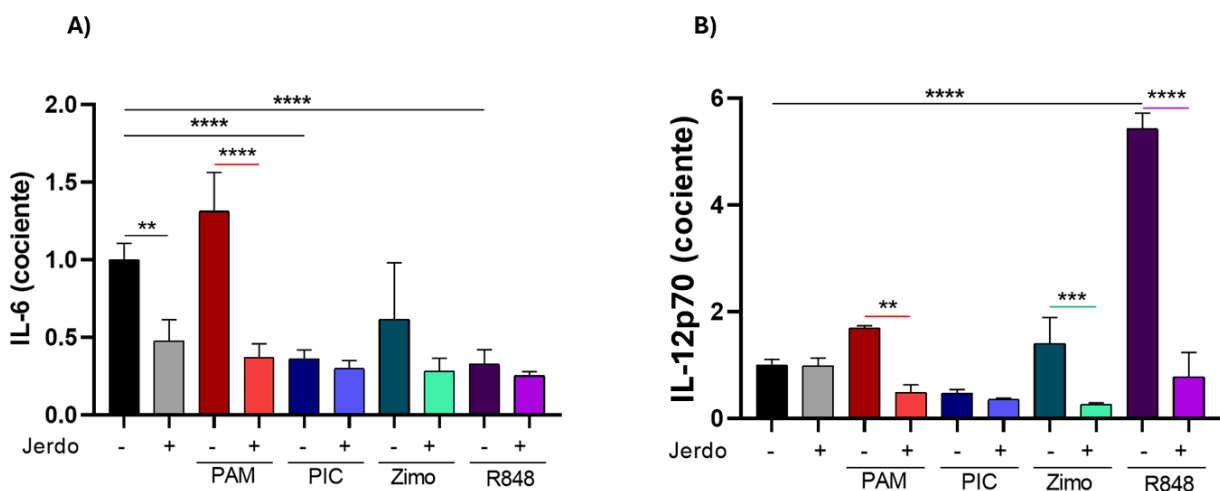


Figura 36: Expresión de IL-6 e IL-12p7- por las BMDc estimuladas con ligandos de TLR en presencia de Jerdo-Ec. Se analizó por ELISA la expresión de citoquinas secretadas por las CD estimuladas con Jerdo-Ec (2 h) en presencia de polimixina B y luego incubadas con (PAM) (rojo), PIC (azul), Zimo (verde) y R848 (morad), ligandos de diferentes TLR. La presencia o ausencia de Jerdo-Ec se señala con los signos +/- . Se indica con asteriscos (*) la significancia estadística entre los resultados, siendo $p^{**}<0.01$, $p^{***}<0.001$ y $p^{****}<0.0001$ (One-way ANOVA). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism versión 8.0.2.

Si observamos los resultados obtenidos para la IL-12p70 (**Figura 36B**), su producción se vio considerablemente aumentada por la estimulación de las DC con PAM, Zimo y R848. Por otro lado, la incubación con Jerdo-Ec provocó un descenso significativo en la producción de IL-12p70 en aquellas DC estimuladas ante determinados ligandos de TLR.

Analizando en conjunto los resultados observados para la expresión de IL-6 e IL-12p70 podríamos afirmar que Jerdo-Ec tiene un efecto inhibitor sobre su producción por DC.

5. Discusión

Como mencionamos anteriormente, uno de los desafíos más comunes en la producción recombinante de desintegrinas es la correcta formación de sus enlaces disulfuro ^{7,18}. Las desintegrinas pueden presentar entre 4 y 16 residuos de cys que sostienen su integridad estructural ^{6,7}. Si estos enlaces no se forman adecuadamente, se puede generar una proteína que no sea funcional, algo que puede ocurrir regularmente en sistemas bacterianos ^{75,76}.

Por otro lado, la formación de cuerpos de inclusión en sistemas bacterianos es algo común y aunque se pueda recuperar proteína resolubilizándola, esto reduce el rendimiento ⁷⁵⁻⁷⁸.

Muchas veces el rendimiento de las desintegrinas recombinantes es relativamente bajo, ya que hay varias etapas en las que puede haber pérdidas, como en la purificación, al remover la proteína de fusión, o el tag, lo que hace que la producción pueda ser desafiante ⁷⁵⁻⁷⁸.

Por último, hay que tener en cuenta que las desintegrinas pueden ser susceptibles a la degradación por proteínas del hospedero, especialmente en sistemas bacterianos ⁷⁸. Este problema puede resolverse con proteínas de fusión, utilizando cepas deficientes de proteasas o recurriendo a inhibidores de proteasas ⁷⁸.

Confirmar la funcionalidad de una proteína recombinante es fundamental para cualquier aplicación que se le vaya a dar. La integridad estructural puede ser analizada por espectroscopía de dicroísmo circular, observando la estructura secundaria. Por espectrometría de masa es posible confirmar su masa molecular o formación de los puentes disulfuro. Técnicas como la resonancia magnética nuclear o la cristalografía de rayos X también pueden aportar información relevante ^{11,13}. Otras alternativas incluyen ensayos de unión al ligando, por ejemplo, en el caso de las desintegrinas se pueden realizar ensayos tipo ELISA o resonancia de plasmón superficial, pudiendo determinar la especificidad o la afinidad de la unión ^{18,24,25}.

Ensayos de adhesión celular o ensayos de migración con células que expresan el ligando de la desintegrina, son otras formas de evaluar su actividad. En general, estos ensayos son llevados a cabo con células endoteliales, líneas celulares tumorales o plaquetas ^{18,24,45}.

Si la desintegrina en cuestión se adhiere a componentes de la MEC, es posible analizar la inhibición utilizando métodos basados en la fluorescencia o por colorimetría (como los ensayos tipo ELISA), pero también pueden evaluarse la migración o formación de tubos, si se la desintegrina reconoce una integrina que participe en estos procesos ^{24,25}.

Para las desintegrinas con motivos RGD se utiliza agregometría de transmisión de luz como ensayo estándar para evaluar su actividad, debido a que son potentes inhibidores de la agregación plaquetaria ⁹².

A continuación, se discuten los resultados de esta tesis desde distintos puntos de vista, con el objetivo de interpretar los principales hallazgos y contextualizarlos en el marco del conocimiento actual.

5.1 Expresión y purificación de proteínas recombinantes

5.1.1 Producción y purificación de jerdostatina recombinante en *E. coli*

La jerdostatina es una desintegrina corta (~4.6 kDa) que fue descubierta a partir del ADNc de la glándula de veneno de *P. jerdonii* por Sanz *et al.* (2005). Es sintetizada a partir de un ARNm corto, que codifica para tres dominios peptídicos; un péptido señal, un propéptido y el dominio desintegrina. Esta proteína se ha producido de forma recombinante principalmente en sistemas bacterianos (*E. coli* BL21) ^{18,24}, expresando únicamente el dominio desintegrina con la finalidad de obtener directamente la proteína madura, ya que normalmente las proteínas de venenos son procesadas, eliminando el péptido señal y el propéptido.

De acuerdo con la bibliografía, la jerdostatina ha sido expresada utilizando el plásmido pET-32a, insertando la secuencia del dominio desintegrina digiriendo con las enzimas KpnI y XhoI ²⁴. Utilizando esta construcción como referencia, diseñamos el plásmido (pET-32a/Jerdos) en Snapgene® ubicando la secuencia de la jerdostatina madura ^{18,24} y el sitio de corte para TEV entre los pares de bases 310 y 161, dando lugar a una proteína de fusión co-expresada con His-tag y TrxA (PFus-Ec) (**Figuras 12 y 13**).

La producción de PFus-Ec se consideró exitosa ya que se pudo expresarla condicionalmente al inducir con IPTG los cultivos transformados, como se puede apreciar en los carriles **Pre** e **Ind** de la **Figura 16**. Además, fue posible purificar sin inconvenientes la proteína de fusión por IMAC (**Elu**), obteniendo un rendimiento aproximado de 1,1 mg por litro de cultivo. Tras la digestión de PFus-Ec con TEV y una posterior IMAC, se logró purificar la jerdostatina recombinante (Jerdo-Ec) (**Figura 19, carril FT**). El rendimiento fue de aproximadamente 0,56 mg por litro de cultivo. Por último, gracias al análisis por espectrometría de masas, se pudo comprobar la identidad de la desintegrina con una cobertura de la secuencia del 72,7 %.

A pesar de que el rendimiento obtenido está dentro de los valores reportados para la expresión de jerdostatina en *E. coli* ^{18,23}, podrían buscarse alternativas para la optimización del rendimiento. El mayor problema que se presentó a la hora de purificar Jerdo-Ec, fue la pérdida de solubilidad al digerir con TEV, ya que se formaba un precipitado insoluble, probablemente debido a la naturaleza de la proteína. Al tratarse de una desintegrina corta, la estructura de la jerdostatina es compacta y está sostenida por cuatro enlaces disulfuro ^{6,7,18}. Además, es normal que los residuos menos polares de las desintegrinas se orienten hacia el exterior de la molécula, lo que puede reducir su solubilidad ⁹⁵. Sin embargo, según la predicción del *software* Protein-Sol - disponible en línea - que predice la solubilidad de

una proteína en base a su secuencia, la Jerdo-Ec debería ser una proteína soluble. El análisis de *Protein-Sol*, indicó una solubilidad relativa de 0,72, respecto a la solubilidad promedio de las proteínas de *E. coli*, cuyo valor es de 0,45. De esta forma, se establece que cualquier proteína con una solubilidad superior a dicho valor, sería soluble⁹⁶. Considerando esta información y que Jerdo-Ec precipitaba al digerirse, podríamos asumir que no está plegada correctamente. Al mismo tiempo, se observó que la digestión de PFus-Ec con TEV no fue completa, como se aprecia en la mezcla recuperada de la digestión (**Figura 19**). Por lo tanto, sería interesante discutir aspectos que pudieran mejorar el rendimiento de obtención de la Jerdo-Ec.

Algunas alternativas que podrían considerarse para una posible optimización de la digestión incluyen: i) regular las condiciones de digestión, ii) cambiar la secuencias de la proteína utilizada para la digestión, o iii) aplicar alguna estrategia de *refolding*^{83,93,94}.

Como se indicó en Materiales y Métodos la digestión de PFus-Ec se llevó a cabo a 4°C, en buffer fosfato (pH 7,4, NaCl 150 mM) como se indicó previamente en la bibliografía²⁴. Para evitar o reducir la precipitación de PFus-Ec, realizamos la digestión en diferentes condiciones. Por ejemplo, cambiando el buffer fosfato por un buffer 50 mM Tris HCL, pH 8, con NaCl 150 mM, otro buffer de uso rutinario para la expresión de proteínas recombinantes⁸⁵. Esto se realizó tanto a 4°C como a TA, sin registrarse cambios significativos en la formación de precipitado, descartando la posibilidad de que el buffer o la temperatura pudiese intervenir en el proceso de agregación. Por otro lado, considerando la tendencia de la Jerdo-Ec en precipitar una vez digerida con TEV, el clivaje en columna se descartó, para evitar perder la resina o dañar la columna. También evaluamos los efectos del agregado de 10% de glicerol al buffer de diálisis, sin evidenciarse resultados positivos.

Una alternativa a probar, ya que no fue abordada en nuestra estrategia experimental, sería modificar la concentración de sales durante (o luego) de la digestión. Esto podría tener efectos beneficiosos sobre la solubilidad de Jerdo-Ec ya que el cambio en la fuerza iónica del medio afecta la carga electrostática de la proteína, modulando su hidratación.

Por último, considerando que la precipitación y la pérdida de solubilidad pueden estar relacionadas con el plegamiento de la proteína, podrían probarse estrategias de *refolding* para resolver este problema^{93,94}. Este tipo de abordajes se ha empleado con proteínas derivadas del veneno de serpiente y otros péptidos ricos en enlaces disulfuro^{83,94}. En nuestro caso, se recurrió a un protocolo de pares redox utilizando glutatión reducido/oxidado, en presencia y ausencia de urea, sin lograr mejorar la solubilidad de la proteína, por lo que se descartó la implementación de los mismos en producciones posteriores.

Como se mencionó anteriormente, BL21 ha sido la cepa de *E. coli* más utilizada para la expresión de jerdostatina^{18,23,24}. No obstante, también se ha realizado la producción de esta desintegrina en la cepa Origami, aunque ésta únicamente se empleó en las primeras producciones de la proteína, siendo expresada en BL21 según publicaciones posteriores^{18,23,24}. En nuestro caso, se utilizó la cepa Rosetta(DE3)pLysS principalmente por su disponibilidad en el laboratorio. Esta cepa, derivada de BL21, cuenta con la ventaja de suprimir la expresión basal de la proteína de interés gracias a la inhibición de la ARN-polimerasa del promotor T7, permitiendo regular la expresión inducida por IPTG. Esta característica le permite, además, evitar la sobreexpresión de proteína recombinante, favoreciendo el plegamiento adecuado de proteínas solubles, y minimizando la formación de cuerpos de inclusión⁹⁷. En base a esto, la cepa Rosetta no tendría desventajas en cuanto a la producción recombinante de jerdostatina, lo cual explicaría que se obtuvo un rendimiento que está dentro de los valores reportados. Sin embargo, podría probarse una cepa diferente, que esté diseñada para maximizar el plegamiento de proteínas ricas en cisteínas, como la SHuffle®⁹⁸. Esta cepa carece de las reductasas *trxB* y *gor* y posee con una mutación supresora de la subunidad C de la alquil hidroperóxido reductasa (*ahpC*), favoreciendo la formación de enlaces disulfuro con una gran fidelidad en el citoplasma bacteriano⁹⁸. Si bien nuestro problema surgió al momento de realizar la digestión, el uso de una cepa bacteriana con estas características podría repercutir positivamente en la solubilidad de Jerdo-Ec luego de ser clivada.

Otra alternativa experimental que podría permitir un mejor rendimiento post-digestión podría ser utilizar una proteasa diferente para escindir la jerdostatina de la proteína de fusión. No obstante, cambiar la proteasa implica rediseñar el plásmido para que cuente con la secuencia blanco de la enzima que se elija para este fin. Algunos ejemplos comunes son la enterokinasa o la trombina, aunque puede utilizarse una proteasa específica para una secuencia SUMO (small ubiquitin-like modifier), como la Ulp1⁹⁹. También se podría considerar expresar la desintegrina inmadura en forma de propéptido con su señal de secreción incluida. Tal vez de esta forma, el dominio desintegrina se pliegue adecuadamente, logrando un mayor rendimiento. No obstante, habría que considerar algunos factores: que la señal de secreción nativa no sea la adecuada para un sistema procarionta y que la expresión de la proteína inmadura no posea un dominio desintegrina funcional. En este caso, debería recurrirse a un sistema de expresión que cuente con la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales para eliminar el propéptido, o bien, incluir entre el propéptido y el dominio desintegrina, un sitio de corte para una proteasa. Esto último conlleva el riesgo de que el sitio de corte no sea fácilmente accesible para la enzima.

5.1.2 Producción de jerdostatina recombinante en *D. melanogaster*

Gracias a la posibilidad de acceder a la línea celular S2 como sistema de producción heterólogo, se decidió diseñar el plásmido pDro-Ext/jerdos con la perspectiva de obtener las siguientes ventajas; mejorar el rendimiento respecto al obtenido para Jerdo-Ec, la posibilidad de optimizar la formación de enlaces disulfuro, la ausencia de endotoxinas (propias de un sistema bacteriano) y por el aporte formativo que esto supone para la maestría en la que se enmarca este proyecto. Si bien utilizar un sistema eucariota para la producción heteróloga de proteínas es más costoso que un sistema bacteriano y en general, ofrece un rendimiento menor que el procarionta ^{25,83}, las S2 cuentan con algunos beneficios. En primera instancia, poseen organelos especializados que favorecen el plegamiento y la formación de enlaces disulfuro. Esta característica de las células eucariotas, puede ofrecer un mejor resultado en la síntesis de proteínas que requieran de un plegamiento complejo como las desintegrinas. Recordemos que en esta familia rica en cisteínas (y de origen animal), la formación correcta de sus enlaces disulfuro es crucial para su estructura y función ^{6,7,18}.

Por otro lado, las células S2 no producen endotoxinas, un aspecto muy relevante para nuestro proyecto, donde uno de nuestros principales objetivos es la evaluación del efecto de la jerdostatina en la maduración de DC. Para evaluar propiedades inmunológicas de proteínas, ya sea *in vivo* o con células *in vitro*, es de suma importancia que la muestra no contenga contaminantes que puedan alterar los resultados. En efecto, la presencia de endotoxinas puede enmascarar los potenciales efectos que se quieren analizar, ya que las DC cuentan con receptores capaces de reconocer LPS, induciendo su maduración ^{54,55,57}. Por lo tanto, la obtención de la jerdostatina en el sistema bacteriano requiere de pasos extra de purificación, o bien, del añadido de reactivos adicionales a los ensayos para neutralizar sus efectos, como se discutirá más adelante.

Las células S2 permiten el desarrollo de líneas estables al ser capaces de incorporar los plásmidos directamente en su genoma. Además, poseen la aptitud para insertar numerosas copias en una única transfección, potenciando así la expresión de la proteína de interés. En este aspecto, las proteínas producidas pueden ser secretadas al medio extracelular, reduciendo el estrés al que se somete a las células y facilitando su posterior purificación gracias a que las S2 liberan pocas proteínas hacia el espacio extracelular ¹⁰⁰. Cabe destacar

qué estas células son capaces de alcanzar una elevada densidad celular sin el requerimiento de suero o CO₂¹⁰⁰.

Luego de una transfección exitosa, se indujo la expresión de las células y al cabo de 7 días se recogió la suspensión celular y se analizó el sobrenadante para detectar la presencia de Jerdo-Dm gracias al strep-tag unido a la proteína. Como se mostró en los resultados, se comprobó la presencia de la etiqueta mediante *western blot* (**Figura 21**) y dot blot (**Figura 22**). Específicamente en el western blot, las bandas que se visualizaron resultaron ser muy débiles, pero por debajo de los 10 kDa, lo que coincide con la presencia de la proteína. Al realizarse el dot blot, se decidió concentrar una muestra del sobrenadante recogido a las 168 h. La muestra concentrada 20 veces, se vio más intensa que la muestra sin concentrar, pero con una diferencia notable frente al control de expresión. No obstante, la escasa cantidad de proteína presente en el sobrenadante no justificó continuar con su concentración ni purificación.

Según reporta Juárez *et al.* (2010) la jerdostatina se logró expresar en células humanas, específicamente las HEK-293²⁵. Las células se transformaron de forma transitoria como un paso previo al desarrollo de un modelo murino transgénico condicional. Si bien no se informó el rendimiento que obtuvieron de proteína recombinante en este sistema, se menciona que, en un primer intento de expresar la proteína, la misma fue retenida dentro de las células transfectadas. Eventualmente resolvieron el problema cambiando la señal de secreción²⁵.

En base a esta experiencia, se podría analizar el lisado celular de las S2 transfectadas, para comprobar la retención de la proteína en su interior. Si bien esta opción fue contemplada, no se realizó por falta de tiempo, quedando pendiente a realizarse en próximas instancias. Si efectivamente el problema estuviese en la secreción de la jerdostatina, se podría utilizar una señal de secreción diferente que pudiera ser más adecuada para el sistema de expresión o para la proteína en cuestión. Se ha probado que en algunos casos, la expresión de proteínas con su señal de secreción nativa, ofrece un mejor rendimiento para la producción recombinante en relación a la señal de secreción de plásmidos comerciales¹⁰¹.

Por último, algunos abordajes experimentales para aumentar el rendimiento de expresión de proteínas recombinante en células de insecto comprenden la producción a partir de un único clon, para el desarrollo de una línea que ofrezca un mejor rendimiento. Este principio se basa en que en un cultivo policlonal no todas las células poseen el mismo nivel de expresión de la proteína recombinante. Si se seleccionara alguna de las células que tiene la tasa de expresión más elevada y se desarrollara una línea estable a partir de ese único clon, se lograría aumentar el rendimiento considerablemente.

Ya que no ha podido comprobarse la presencia de jerdostatina madura en el veneno de *P. jerdonii* y pese a que se ha reportado en el veneno de *D. russelli*, la posibilidad de purificar la desintegrina directamente del veneno podría no ser una opción viable. No solo se desconoce la cantidad de proteína allí presente, la purificación a partir del veneno crudo siempre es más laboriosa y difícil de optimizar que la producción recombinante.

Debido al muy bajo rendimiento que se obtuvo para Jerdo-Dm, todos los ensayos realizados se hicieron exclusivamente con Jerdo-Ec.

5.2 Ensayos funcionales de Jerdo-Ec

Para evaluar la capacidad de la Jerdo-Ec en reconocer a la integrina $\alpha 1\beta 1$ realizamos ensayos de unión tipo ELISA.

En primera instancia se evaluó que la integrina $\alpha 1\beta 1$ fuera capaz de unirse al colágeno. Al tratarse de una proteína transmembrana, no se expresó la proteína completa, sino que se produjo el heterodominio soluble formado por los ectodominios de ambas subunidades. La producción se realizó en células S2 previamente modificadas para la expresión independiente de estos ectodominios unidos a las secuencias Fos y Jun, que se unen formando una cremallera que permiten la formación del ectodominio $\alpha 1\beta 1$ (**Figura 15 B**).

La integrina $\alpha 1\beta 1$ reconoce de forma específica y con alta afinidad al colágeno tipo IV, uniéndose a la región denominada “fragmento CB3”. Para que la interacción con su ligando ocurra, las integrinas necesitan de la presencia de cationes metálicos divalentes, por lo que los ensayos realizados se hicieron en presencia de Mg^{2+} y Mn^{2+} , o bien, en presencia de EDTA, que funciona como agente quelante, secuestrando estos cationes e impidiendo la unión integrina-ligando. Como se puede ver en la **Figura 25**, evaluamos la unión de la integrina $\alpha 1\beta 1$ tanto al colágeno puro, como al fragmento CB3 aislado, obteniendo resultados similares. La integrina se une de forma dosis-dependiente, aumentando la absorbancia conforme lo hace la concentración de integrina, mientras que en presencia de EDTA la interacción se abolió completamente. Con estos resultados, podemos concluir que el ectodominio soluble de la integrina $\alpha 1\beta 1$ reconoce al fragmento CB3 aislado o en el colágeno IV y que su obtención fue exitosa.

La expresión recombinante de la integrina $\alpha 1\beta 1$ se realizó principalmente para comprobar la funcionalidad de Jerdo-Ec, cuyo ligando específico es esta integrina. Se ha comprobado que esta desintegrina no interactúa con otras integrinas y que, al unirse a la $\alpha 1\beta 1$, bloquea su interacción con el fragmento CB3 del colágeno ^{18,23,24,25}. Sin embargo, existe poca información sobre esta interacción, pues se desconoce el sitio exacto de unión del motivo RTS a la integrina $\alpha 1\beta 1$ o su mecanismo de acción ²⁴. Estudios previos realizados con el dominio α -I aislado, revelaron que la jerdostatina no interfiere en la unión del dominio α -I al CB3 del colágeno, lo que sugiere que la desintegrina no reconoce este dominio en la integrina ²⁴. Esto abre la puerta para, al menos, dos posibilidades: i) que el bloqueo de la interacción integrina $\alpha 1\beta 1$ - colágeno por parte de la jerdostatina sea por efecto alostérico; o ii) que el motivo RTS reconozca una secuencia o estructura formada en el ectodominio $\alpha 1\beta 1$ dimerizado. Además, durante dichos ensayos se demostró que la unión de jerdostatina a la integrina es independiente de cationes divalentes ²⁴.

Para evaluar la interacción entre la integrina $\alpha 1\beta 1$ y la jerdostatina recombinante se inmovilizó Jerdo-Ec en la placa, incubándola con diferentes concentraciones de la integrina. Los resultados (**Figura 26**) demostraron que Jerdo-Ec es capaz de unirse al ectodominio de la integrina $\alpha 1\beta 1$ soluble de forma dosis dependiente, lo que coincide con los datos reportados en la bibliografía ^{18,23,24,25}. Sin embargo, al momento de evaluar el bloqueo de la interacción integrina $\alpha 1\beta 1$ -colágeno por Jerdo-Ec, el resultado no coincidió con lo esperado (**Figura 27**), ya que la absorbancia debida a la unión entre la integrina y el colágeno no disminuyó, sino que, paradójicamente, aumentó. Es importante resaltar que este ensayo se realizó inmovilizando colágeno en la placa, a los que se añadieron mezclas de diferentes concentraciones de jerdostatina preincubadas con dos concentraciones de integrina $\alpha 1\beta 1$ (3 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Si bien para las mezclas con 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de integrina $\alpha 1\beta 1$ no es tan notorio, al observar el comportamiento de la absorbancia para las mezclas con 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de integrina $\alpha 1\beta 1$, se apreció un claro aumento en función de la concentración de jerdostatina. Para la detección del ensayo utilizamos un anticuerpo específico dirigido contra la subunidad $\beta 1$ de la integrina. Por lo tanto, la presencia de jerdostatina, debería bloquear la unión de la integrina al colágeno inmovilizado en la placa. De esta forma, se esperaría una tendencia inversamente proporcional a la obtenida, donde se partiría de una absorbancia elevada, que disminuiría conforme aumenta la concentración de jerdostatina.

En base a este resultado, podemos especular que Jerdo-Ec se encuentra mal plegada y no es funcional. Si bien en el ensayo de interacción anterior donde se inmovilizó Jerdo-Ec, se detectó la presencia de la integrina $\alpha 1\beta 1$. Esto podría deberse a que al inmovilizarse una proteína en una fase sólida, esta no mantiene su conformación nativa, lo que explicaría por qué se detectó la unión, aunque la jerdostatina recombinante se encuentre mal plegada. En estas condiciones la Jerdo-Ec podría interactuar con la integrina, pero mediante una interacción que no sería la adecuada para inhibir la unión de la integrina con el colágeno. Esto podría ser reevaluado diseñando un anticuerpo específico contra la jerdostatina y realizando un ensayo tipo ELISA donde se inmovilice la integrina $\alpha 1\beta 1$ y se detecte la presencia de Jerdo-Ec unida a la integrina. Por otro lado, también podríamos probar otra variante del ensayo, que implique analizar la capacidad de la Jerdo-Ec inmovilizada de bloquear la interacción de la integrina $\alpha 1\beta 1$ con el colágeno, añadiendo, por ejemplo, una mezcla pre incubada de estas proteínas. Por lo tanto, ante estos resultados, resulta imperativo profundizar en el análisis del plegamiento o estructura tridimensional de la Jerdo-Ec. Si bien se comprobó la secuencia y peso de la proteína por espectrometría de masas, la misma se realizó en condiciones reductoras. Se podría repetir el análisis, pero en condiciones no reductoras, para observar el emparejamiento de los enlaces disulfuro. De

esta forma es posible comparar la masa esperada de la proteína con los enlaces digeridos o con los enlaces formados.

Por otro lado, es interesante resaltar que se han realizado estudios por resonancia magnética nuclear (NMR) de la jerdostatina recombinante¹³. Si se hiciera NMR de Jerdo-Ec, podrían compararse los resultados obtenidos y evaluar las diferencias entre ambas estructuras. Asimismo, estudiar el plegamiento y la estructura secundaria de Jerdo-Ec por espectroscopía de dicroísmo circular podría resultar una estrategia complementaria y útil en este sentido. El dicroísmo circular es una herramienta adecuada para analizar el plegamiento global de proteínas pequeñas, ya que permite determinar su estructura secundaria y detectar estados plegados, parcialmente plegados o desordenados, así como cambios conformacionales inducidos por distintas condiciones experimentales¹⁰². Sin embargo, si bien el dicroísmo circular presenta limitaciones para proteínas de muy bajo peso molecular, esta técnica resulta útil para evaluar la presencia de estructura secundaria estable o inducida, así como para identificar estados desordenados o cambios conformacionales bajo distintas condiciones experimentales¹⁰².

La información aportada por el análisis predictivo mediante I-TASSER (*Iterative Threading ASSEmbly Refinement*) reveló que la secuencia aminoacídica de la jerdostatina adopta una conformación predominantemente desordenada (*random coil*) y una mínima proporción de hebras β , con ausencia de α -hélices¹⁰³. La predicción de accesibilidad al solvente, indica que la mayoría de los residuos tiene una accesibilidad relativa baja, con valores inferiores a 5, siendo 0 el valor de aquellos residuos “enterrados” en la estructura y 9 para los que exhiben la máxima exposición al solvente. Solamente 11 de los 43 residuos presentan un valor > 5 . Por otro lado, el programa identificó estructuras reportadas en el Protein Data Bank (PDB) con similitud de secuencia, entre ellas la propia jerdostatina (2w9oA)¹³ así como otras desintegrinas; obtustatina (1mpzA)¹⁰⁴ y echistatina (2echA)¹⁰⁵, con motivos de unión KTS y RTS respectivamente.

Además, el software diseñó un modelo tridimensional con un C-score de 0,14 y un TM-score de 0,73, parámetros que indican que el modelo presenta una topología global confiable^{103, 106, 107}.

De forma complementaria, los resultados de COFACTOR y COACH (*Consensus approach*) (predictores funcionales en base a similitud entre estructuras) sugieren que la jerdostatina se asociaría a proteínas extracelulares con posibles interacciones con cationes metálicos, algo que concuerda con el ligando de la jerdostatina, la integrina $\alpha 1\beta 1$ ^{103,106,107}.

5.3 Efectos moduladores de Jerdo-Ec sobre DC

Hasta el momento se han estudiado los efectos de la jerdostatina en varios modelos celulares *in vitro*, con la finalidad de utilizarla como potencial agente terapéutico anti-angiogénico ^{6,12,17,18,23-25}. Sin embargo, no hay estudios realizados sobre los efectos que esta desintegrina pueda tener sobre células del sistema inmune.

Debido al rol fundamental que cumplen las DC, como células centinelas y fundamentalmente como APC profesionales, nos propusimos evaluar los posibles efectos inmunomoduladores que podría tener la jerdostatina sobre esta población celular. Esto es de especial importancia, ya que si la Jerdo-Ec es administrada *in vivo*, desencadenará una respuesta inmune que podría influir o alterar su función biológica.

Para ello se diferenciaron DC de precursores de médula ósea de ratón y se trataron con jerdostatina, para luego estimularlas con diferentes ligandos de TLRs y así analizar la maduración de las DC por medio de la expresión de moléculas de superficie, como MHC II y las moléculas de co-estimulación CD40 y CD86.

Para desencadenar la maduración de las DC en los ensayos iniciales se seleccionaron PIC y Zimo. El PIC es un ARN doble hebra sintético, que consiste en una cadena de ácido poli inosínico que está emparejado a una hebra de ácido policitidílico. Esta molécula simula un ARN doble hebra viral, por lo que es capaz de activar la respuesta inmune ^{106,109}. Es reconocida por receptores intracelulares como el TLR3 endosomal, o el RIG-I citoplasmático, que al interactuar con este ligando producen citoquinas proinflamatorias, como TNF- α e IL-6, pero también interferones de tipo I, que se caracterizan por activar una potente respuesta viral ^{46,106}. Por esta razón, PIC es una molécula muy utilizada en investigación para estimular respuestas antivirales *in vitro* e *in vivo*, así como estímulo de la maduración de DC, favoreciendo la presentación de antígenos y la activación de LT ¹¹⁰.

Por su parte, el Zimo es un preparado hecho a partir de la pared de levaduras, las cuales son ricas en polisacáridos reconocidos por TLR2, receptor ubicado en la membrana extracelular. Como se trata de un agonista de un TLR, su detección induce la expresión de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL12p70), pero también IL-10, promoviendo un ambiente tolerogénico ¹¹¹.

Para estos primeros ensayos se consideró la incorporación de polimixina B, porque Jerdo-Ec fue producida en bacterias, implicando el riesgo de contaminación con endotoxinas. Por lo tanto, se hicieron dos grupos, a uno de ellos no se le agregó el

antibiótico y al otro si. Los resultados observados en ausencia de polimixina B indicaron que Jerdo-Ec estimuló a las DC, efecto que se perdió al incubarse con polimixina B, indicando que la proteína recombinante purificada está contaminada con LPS.

En la **Figura 29**, se observa como la presencia de Jerdo-Ec, en ausencia de polimixina B, estimuló la expresión de CD40 (**29A**) y MHCII (**29E**). Esto no sucede en presencia del antibiótico (**29 B y F**). Este efecto se puede apreciar mejor en las células que no fueron tratadas con ligandos de TLR. Estos resultados, en conjunto permiten concluir que la proteína recombinante purificada está contaminada con LPS.

Estos resultados son coherentes y esperados. Durante el desarrollo de las diferentes actividades, no se evaluó la presencia de endotoxinas ni se utilizaron métodos para su eliminación, lo cual debería de realizarse si se busca utilizar la Jerdo-Ec en ensayos *in vivo*. Las endotoxinas son componentes de la membrana exterior de bacterias, como *E. coli*. Se trata de LPS que se purifican junto con la proteína recombinante ya que es capaz de resistir los pasos de purificación estándar. Además, cantidades muy pequeñas de LPS (~100 pg/μg de proteína) son capaces de activar células inmunes a través de la señalización del TLR4¹¹². Este tipo de respuestas es un problema cuando se quiere evaluar la activación de células por parte de un compuesto, por lo que para analizar los efectos inmunomoduladores de Jerdo-Ec es necesario eliminar el efecto causado por LPS para que no condicione los resultados.

Si bien nosotros decidimos emplear polimixina B en nuestros ensayos, debido a que se une a LPS y neutraliza sus efectos. Aunque es una herramienta ampliamente usada en este tipo de experimentos, lo ideal sería eliminar las endotoxinas contaminantes en Jerdo-Ec previo a su uso en células, ya que recurrir a la polimixina B no siempre es posible¹¹³. Su aplicación se ve restringida a ensayos *in vitro* y aún así, su utilidad puede ser limitada, ofreciendo un bloqueo parcial de LPS. Por lo tanto, conviene eliminar el LPS contaminante de una proteína recombinante empleando, por ejemplo, columnas de polimixina B¹¹⁴.

Todos los ensayos con células posteriores, se realizaron en presencia de polimixina B y se incorporaron otros dos ligandos de TLR para analizar los efectos de Jerdo-Ec; PAM3CSK4 y R848. Pam3Cys-Ser-Lys4 (PAM) es reconocido por TLR1/2 dada su estructura sintética que simula un lipopéptido triacilado de origen bacteriano. La interacción de PAM con TLR1/2 dispara vías de señalización que culminan en la activación de NF-κB y la consecuente producción de citoquinas proinflamatorias (IL-6, TNF-α e IL-12p70)^{115,116}. Por otro lado, R848 es una imidazoquinolina sintética que estimula respuestas antivirales al interactuar con TLR7/8¹¹⁷. Este receptor endosomal está principalmente enfocado en la respuesta antiviral a través del reconocimiento de ARN. Las citoquinas proinflamatorias

producidas por su activación incluyen interferones de Tipo I, característicos de la defensa antiviral, pero también otras citoquinas, como IL-6 e IL-12 ¹¹⁷.

Si analizamos el efecto de los ligandos de TLR sobre las moléculas de coestimulación (**Figuras 31 - 33**) sin considerar los efectos de la jerdostatina, vemos que PAM no estimula la expresión de CD40 (**Figura 31**). Si bien existen evidencias de CD40 siendo regulado positivamente en células inmunes por los efectos de PAM, nuestros resultados fueron de tendencia positiva sin llegar a un cambio significativo. Por otro lado, CD86 (**Figura 32**) sí estaría estimulado por PAM, siendo esto un resultado esperado ¹¹⁵. Si bien la expresión de MHCII debería verse aumentada por PAM, ya que la activación de los TLR induce su expresión, nuestros resultados no mostraron diferencias respecto a su expresión basal (**Figura 33**).

Al ser un agonista de un TLR que simula un ARN bacteriano, era de esperar que PIC estimulase a las DC, activándolas e iniciando su maduración. Este proceso induce la expresión de las moléculas coestimuladoras analizadas ^{118,119}. Sin embargo, nuestros resultados no muestran cambios significativos en la expresión de CD40, CD86 ni MHCII. En todo caso, podríamos decir que hay un pequeño aumento en la expresión de CD86, pero que no llega a ser estadísticamente significativo (**Figura 32**).

La estimulación con Zimo parece ser variada. Por un lado, es un buen potenciador de la activación de DC promoviendo la expresión de moléculas de estimulación y citoquinas como IL-6 e IL-12, pero al mismo tiempo, hay evidencias de que puede promover la secreción de IL-10 ^{52,120,121}. En nuestra experiencia, el ZIMO fue capaz de promover la expresión de CD40 (**Figura 31**), CD86 (**Figura 32**) y MHCII (**Figura 33**) significativamente.

Además de Zimo, R848 fue el agonista de TLR que mostró los efectos más notorios, estimulando la expresión de las 3 moléculas de superficie estudiadas, lo que coincide con la bibliografía ^{122,123,124}. Sin embargo, sería conveniente realizar más ensayos con diferentes concentraciones de los ligandos de TLR y así seleccionar la más adecuada.

Ahora bien, si tomamos en cuenta los efectos generados por Jerdo-Ec, vemos que para cada caso donde se vió estimulada la expresión de alguna molécula, la proteína recombinante fue capaz de anular su efecto. Por ejemplo, en la **Figura 31** se observa como disminuye la expresión de CD40 estimulada por Zimo y por R848. Si bien para las células tratadas con Zimo el efecto es claro, la disminución de la expresión en las DC que fueron incubadas con R848 son similares a los niveles basales de CD40.

La expresión de CD86 (**Figura 32**) mostró una disminución generalizada de su expresión en las DC expuestas a la jerdostatina recombinante, en algunos casos, incluso por debajo de los niveles basales. Si bien en ausencia de ligandos de TLR, se aprecia una disminución no

significativa, la estimulación de los ligandos no parece haber tenido efecto cuando se añadió jerдостatina a las células.

Al analizar la **Figura 33**, solo se observó un aumento significativo de la expresión de MHC II para las DC estimuladas con Zimo y R848. Este resultado no es el esperado, ya que la expresión de MHC II aumenta como parte del proceso de maduración de las DC. Posiblemente, la cantidad de ligando utilizada no fue suficiente para que se observe un incremento significativo y no solo una tendencia en aumento. Por otro lado, la reducción en la expresión de MHCII fue significativa en todas las DC que fueron tratadas con Jerdo-Ec.

Si integramos toda esta información, podemos concluir que la jerдостatina tiene efectos inmunomoduladores sobre la maduración de las DC. Por un lado, las moléculas de MHC no parecen expresarse, ya que su detección por citometría de flujo es mucho menor que en las DC control cuyos TLR no fueron estimuladas.

En el caso de las moléculas de co-estimulación, si igualmente se expresan en presencia de Jerdo-Ec, al ser tratadas con alguno de los ligandos de TLR, sus niveles igualmente son menores en comparación con las células tratadas con dicho agonista. En suma, podríamos afirmar que la jerдостatina fue capaz de inhibir la maduración de las DC.

Además de estudiar la expresión de CD40, CD86 y MHCII, decidimos evaluar la presencia de las citoquinas IL-6 e IL-12 en el sobrenadante de las DC. Estas citoquinas son sintetizadas y secretadas principalmente por células del sistema inmune en respuesta a señales de peligro, que pueden ser exógenas o endógenas.

IL-6 se produce por la señalización de TLRs, ya sea por PAMPs o DAMPs, pero también por la estimulación de otras citoquinas, como IL-1b o TNF- α . Esta citoquina suele ser producida por las DC previo a su maduración, en una etapa más temprana de la infección. Por otro lado, la IL-12, es secretada tardíamente, luego de que las DC hayan madurado. Además, tiene un rol importante en la diferenciación de LT CD4+, polarizandolos hacia el perfil Th1.

Los resultados de la **Figura 36A**, indican que la expresión de IL-6 no muestra diferencias significativas entre las células que no fueron expuestas a agonistas de TLR, PAM y Zimo, pero la expresión fue significativamente menor para PIC y R848. Cuando se comparan estos valores, con los de las células incubadas con Jerdo-Ec, vemos que la expresión disminuye para las células que no fueron tratadas con ligandos de TLR y las que fueron expuestas a PAM y Zimo.

En la **Figura 36B**, los resultados de la expresión de IL-12(p70), muestran que únicamente el R848 fue capaz de estimular la producción de esta citoquina, aunque PAM y Zimo exhibieron una tendencia positiva, que se vió abolida por la presencia de Jerdo-Ec, al igual que los efectos del R848.

Esta información refuerza las conclusiones a las que llegamos analizando el perfil de

expresión de CD40, CD80 y MHCII; Jerdo-Ec es capaz de inhibir la maduración de las DC, por lo que, no se induce la expresión de estas citoquinas.

Reflexionando sobre los resultados obtenidos y teniendo en cuenta la bibliografía consultada, podríamos inferir que la jerdostatina actuaría sobre las DC a través de su interacción con la integrina $\alpha 1\beta 1$. De ser este el caso, surge la hipótesis de que la DC “interpretaría” la unión de Jerdo a la integrina $\alpha 1\beta 1$ como una señal que la retendría en los tejidos periféricos, evitando su maduración.

Para comprobar si efectivamente esta interacción se estaría dando en las BMDC, se pueden tratar las células con anticuerpos bloqueantes contra la integrina $\alpha 1\beta 1$ y evaluar si de esta forma se anula el efecto causado por la jerdostatina. Sin embargo, dado que no hay evidencia directa de la expresión de la integrina $\alpha 1\beta 1$ en BMDC, habría que analizar su expresión por citometría, qPCR y ELISA.

Existe, sin embargo, evidencia que relaciona vías de señalización entre integrinas y TLRs, la misma está enfocada en la familia $\beta 2$, posiblemente por su expresión característica en células del sistema inmune ^{55,125,126}.

La señalización de los TLRs y la integrinas están mediadas por MAP kinasas y son capaces de activar el factor de transcripción NF- κ B. Mientras los TLR señalizan reclutando adaptadores como MyD88 o TRIF, las integrinas, que interactúan con componentes de la MEC, señalizan a través de complejos de adhesión focal, como FAK o Scr. Ambas vías resultan en la activación de NF- κ B, ya sea para procesos inflamatorios, de supervivencia o ambos. Además, se ha registrado que la interacción sinérgica entre la integrina $\alpha 9\beta 1$ con TLR2 y TLR4 promueve en DC y macrófagos, la secreción de citoquinas que polarizan la diferenciación Th17, a través de la señalización mediante ERK ¹²⁷.

5.4 Perspectivas

El presente trabajo y los resultados obtenidos derivan en perspectivas a corto y mediano plazo. En primer lugar, es relevante notar, que Jerdo-Ec no fue capaz de bloquear la unión de la integrina $\alpha 1\beta 1$ al colágeno, a pesar de ser capaz de unirse a dicha integrina. Sería conveniente analizar la estructura y plegamiento de la proteína para confirmar si estas son las correctas. Así, podríamos descartar que los resultados obtenidos en los ensayos con las DC no son a causa de una proteína con un plegamiento inadecuado. De ser el caso y constatarse que Jerdo-Ec está mal plegada, sería conveniente repetir estos estudios con una jerdostatina con su estructura nativa y completamente funcional.

A más largo plazo, existe la perspectiva de utilizar la jerdostatina como un posible tratamiento antiangiogénico para combatir tumores vascularizados. En este caso, es muy importante considerar los efectos que esta pueda tener en otras células que interactúan directamente con el tumor o forman el microambiente tumoral. No se puede considerar al tumor como un objeto extraño o aislado del organismo, pues en el microambiente tumoral numerosos tipos celulares forman una compleja red de interacciones. Y más allá del efecto directo que esta desintegrina pueda tener sobre las células que expresan la integrina $\alpha 1\beta 1$, su administración implica el ingreso de una molécula extraña al organismo, algo que alertará al sistema inmunológico y generará una respuesta en consecuencia. Por esta razón es que nos propusimos estudiar los efectos de la jerdostatina en las DC, dada la escasa o nula información al respecto.

Si bien las desintegrinas no forman parte del principal grupo de toxinas presentes en el veneno de serpiente, son péptidos muy específicos y potentes que disrumen la adhesión celular, afectando la integridad de los tejidos, pero también la agregación plaquetaria y el reclutamiento de leucocitos, que depende (en parte) de las integrinas. De esta forma, su rol, aunque no sea el protagónico, sirve de complemento para potenciar los efectos de las demás familias de toxinas presentes en el veneno. Es importante recordar que, la función del veneno es paralizar o matar a la presa, pues es una herramienta de caza.

Nuestros resultados son sólo un pequeño aporte al conocimiento científico que se ha generado hasta el momento sobre el tema, pero deja en claro que es imprescindible seguir estudiando diferentes aspectos de los efectos que pueda tener la jerdostatina sobre el organismo, previo su implementación como una potencial droga antitumoral. En vistas de seguir contribuyendo con este fin, hay diversos aspectos de este trabajo a seguir profundizando; principalmente, seguir analizando la estructura y funcionalidad de Jerdo-Ec, como mencionamos anteriormente.

Por otro lado, es importante pensar en la optimización del rendimiento en la purificación de jerdostatina recombinante, como se discutió previamente, y en la eliminación del LPS presente en la proteína purificada de *E. coli*. Alternativamente, se podría optimizar la producción en células S2, sopesando siempre la disponibilidad de recursos y la relación entre tiempo, dinero y esfuerzo para lograrlo. Posiblemente, la optimización de la producción en *E. coli* y la posterior purificación por columnas de polimixina sea una alternativa mucho más ventajosa, en general, que optimizar y producir la proteína en las S2 u otro sistema eucariota, siempre y cuando se constate el correcto plegamiento de la proteína recombinante digerida.

Conclusiones finales

En este trabajo logramos obtener jerdostatina recombinante a partir de cultivos de *E. coli* transformadas con un plásmido que contenía la secuencia de la desintegrina madura. La proteína fue expresada y purificada con éxito, obteniéndose un rendimiento acorde a lo reportado por la bibliografía.

Jerdo-Ec fue capaz de unirse a su ligando, la integrina $\alpha 1\beta 1$ en ensayos de unión tipo ELISA, sin embargo no se observaron evidencias de su capacidad de bloquear la unión entre la integrina $\alpha 1\beta 1$ y el colágeno IV.

En estas condiciones, la jerdostatina recombinante fue capaz de inhibir la expresión de moléculas coestimuladoras, MHCII y citoquinas proinflamatorias por parte de DC estimuladas por ligandos de TLR. Dado que estas moléculas son indicadores de la maduración de las DC, podríamos considerar que la Jerdo-Ec inhibe la maduración de estas células, al menos en las condiciones estudiadas.

Bibliografía

- 1 - Burbrink, F. T., & Crother, B. I. (2011). Evolution and taxonomy of snakes. In R. D. Aldridge & D. M. Sever (Eds.), *Reproductive biology and phylogeny of snakes* (pp. 19–53). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b10879-3>
- 2 - Gutiérrez, J. M., Calvete, J. J., Habib, A. G., Harrison, R. A., Williams, D. J., & Warrell, D. A. (2017). Snakebite envenoming. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, Article 17063. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.63>
- 3 - Rani, A. P., & McConnell, M. (2022). Snake venom. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.101716>
- 4 - Tasoulis, T., & Isbister, G. K. (2023). A current perspective on snake venom composition and constituent protein families. *Archives of toxicology*, 97(1), 133–153. <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03420-0>
- 5 - Oliveira, A. L., Viegas, M. F., da Silva, S. L., Soares, A. M., Ramos, M. J., & Fernandes, P. A. (2022). The chemistry of snake venom and its medicinal potential. *Nature reviews. Chemistry*, 6(7), 451–469. <https://doi.org/10.1038/s41570-022-00393-7>
- 6 - Calvete, J. J., & Juárez, P. & Sanz, L. (2009). Snake venomomics and disintegrins. Portrait and evolution of a family of snake venom integrin antagonists. *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. 337-357.
- 7 - Almeida, G. O., de Oliveira, I. S., Arantes, E. C., & Sampaio, S. V. (2023). Snake venom disintegrins update: insights about new findings. *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 29, e20230039. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2023-0039>
- 8 - Yee, K. T., Macrander, J., Vasieva, O., & Rojnuckarin, P. (2023). Exploring Toxin Genes of Myanmar Russell's Viper, *Daboia siamensis*, through De Novo Venom Gland Transcriptomics. *Toxins*, 15(5), 309. <https://doi.org/10.3390/toxins15050309>
- 9 - Calvete, J. J., Schäfer, W., Soszka, T., Lu, W. Q., Cook, J. J., Jameson, B. A., & Niewiarowski, S. (1991). Identification of the disulfide bond pattern in albolabrin, an RGD-containing peptide from the venom of *Trimeresurus albolabris*: significance for the expression of platelet aggregation inhibitory activity. *Biochemistry*, 30(21), 5225–5229. <https://doi.org/10.1021/bi00235a016>
- 10 - Monleón, D., Esteve, V., Kovacs, H., Calvete, J. J., & Celda, B. (2005). Conformation and concerted dynamics of the integrin-binding site and the C-terminal region of echistatin revealed by homonuclear NMR. *The Biochemical journal*, 387(Pt 1), 57–66. <https://doi.org/10.1042/BJ20041343>
- 11 - Xiong, J. P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D. L., Joachimiak, A., Goodman, S. L., & Arnaut, M. A. (2001). Crystal structure of the extracellular segment of integrin alphaVbeta3. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5541), 339–345. <https://doi.org/10.1126/science.1064535>

- 12 - Calvete J. J. (2005). Structure-function correlations of snake venom disintegrins. *Current pharmaceutical design*, 11(7), 829–835. <https://doi.org/10.2174/1381612053381783>
- 13 - Carbajo, R. J., Sanz, L., Mosulén, S., Pérez, A., Marcinkiewicz, C., Pineda-Lucena, A., & Calvete, J. J. (2011). NMR structure and dynamics of recombinant wild type and mutated jerdostatin, a selective inhibitor of integrin $\alpha 1\beta 1$. *Proteins*, 79(8), 2530–2542. <https://doi.org/10.1002/prot.23076>
- 14 - Marcinkiewicz, C., Weinreb, P. H., Calvete, J. J., Kisiel, D. G., Mousa, S. A., Tuszynski, G. P., & Lobb, R. R. (2003). Obtustatin: a potent selective inhibitor of alpha1beta1 integrin *in vitro* and angiogenesis *in vivo*. *Cancer research*, 63(9), 2020–2023.
- 15 - Saviola, A. J., Modahl, C. M., & Mackessy, S. P. (2015). Disintegrins of *Crotalus simus tzabcan* venom: Isolation, characterization and evaluation of the cytotoxic and anti-adhesion activities of tzabcanin, a new RGD disintegrin. *Biochimie*, 116, 92–102. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.07.005>
- 16 - Avraamides, C. J., Garmy-Susini, B., & Varnier, J. A. (2008). Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature reviews. Cancer*, 8(8), 604–617. <https://doi.org/10.1038/nrc2353>
- 17 - Calvete, J. J., Marcinkiewicz, C., & Sanz, L. (2007). KTS and RTS-disintegrins: anti-angiogenic viper venom peptides specifically targeting the alpha 1 beta 1 integrin. *Current pharmaceutical design*, 13(28), 2853–2859. <https://doi.org/10.2174/138161207782023766>
- 18 - Sanz, L., Chen, R. Q., Pérez, A., Hilario, R., Juárez, P., Marcinkiewicz, C., Monleón, D., Celda, B., Xiong, Y. L., Pérez-Payá, E., & Calvete, J. J. (2005). cDNA cloning and functional expression of jerdostatin, a novel RTS-disintegrin from *Trimeresurus jerdonii* and a specific antagonist of the alpha1beta1 integrin. *The Journal of biological chemistry*, 280(49), 40714–40722. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509738200>
- 19 - Brown, M. C., Staniszewska, I., Del Valle, L., Tuszynski, G. P., & Marcinkiewicz, C. (2008). Angiostatic activity of obtustatin as alpha1beta1 integrin inhibitor in experimental melanoma growth. *International journal of cancer*, 123(9), 2195–2203. <https://doi.org/10.1002/ijc.23777>
- 20 - Ghazaryan, N. A., Ghulikyan, L. A., Kishmiryan, A. V., Kirakosyan, G. R., Nazaryan, O. H., Ghevondyan, T. H., Zakaryan, N. A., & Ayvazyan, N. M. (2015). Anti-tumor effect investigation of obtustatin and crude *Macrovipera lebetina obtusa* venom in S-180 sarcoma bearing mice. *European journal of pharmacology*, 764, 340–345. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.07.011>
- 21 - Staniszewska, I., Walsh, E. M., Rothman, V. L., Gaathon, A., Tuszynski, G. P., Calvete, J. J., Lazarovici, P., & Marcinkiewicz, C. (2009). Effect of VP12 and viperistatin on inhibition of collagen-receptor-dependent melanoma metastasis. *Cancer biology & therapy*, 8(15), 1507–1516. <https://doi.org/10.4161/cbt.8.15.8999>

- 22 - Olfa, K. Z., José, L., Salma, D., Amine, B., Najet, S. A., Nicolas, A., Maxime, L., Raoudha, Z., Kamel, M., Jacques, M., Jean-Marc, S., Mohamed, eIA., & Naziha, M. (2005). Lebestatin, a disintegrin from *Macrovipera* venom, inhibits integrin-mediated cell adhesion, migration and angiogenesis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 85(12), 1507–1516. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700350>
- 23 - Sanz-Soler, R., Lorente, C., Company, B., Sanz, L., Juárez, P., Pérez, A., Zhang, Y., Jin, Y., Chen, R., Eble, J. A., Calvete, J. J., & Bolás, G. (2012). Recombinant expression of mutants of the Frankenstein disintegrin, RTS-ocellatusin. Evidence for the independent origin of RGD and KTS/RTS disintegrins. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 60(4), 665–675. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.05.010>
- 24 - Bolás, G., de Rezende, F. F., Lorente, C., Sanz, L., Eble, J. A., & Calvete, J. J. (2014). Inhibitory effects of recombinant RTS-jerdostatin on integrin $\alpha 1\beta 1$ function during adhesion, migration and proliferation of rat aortic smooth muscle cells and angiogenesis. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 79, 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.12.006>
- 25 - Juárez, P., Bolás, G., de Rezende, F. F., Calvete, J. J., & Eble, J. A. (2010). Recombinant expression in human cells of active integrin alpha 1 beta 1-blocking RTS-disintegrin jerdostatin. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 56(6), 1052–1058. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.07.013>
- 26 - Gahmberg, C. G., Fagerholm, S. C., Nurmi, S. M., Chavakis, T., Marchesan, S., & Grönholm, M. (2009). Regulation of integrin activity and signalling. *Biochimica et biophysica acta*, 1790(6), 431–444. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.03.007>
- 27 - Campbell, I. D., & Humphries, M. J. (2011). Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(3), a004994. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004994>
- 28 - Péter, B., Boldizsár, I., Kovács, G. M., Erdei, A., Bajtay, Z., Vörös, A., Ramsden, J. J., Szabó, I., Bősze, S., & Horvath, R. (2021). Natural Compounds as Target Biomolecules in Cellular Adhesion and Migration: From Biomolecular Stimulation to Label-Free Discovery and Bioactivity-Based Isolation. *Biomedicines*, 9(12), 1781. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9121781>
- 29 - Nevo, J. (2011). Novel Players in the Integrin Signaling Orchestra: TCPTP and MDGI: Dissertation. [Dissertation, University of Turku]. University of Turku. <http://urn.fi/URN:ISBN:978-951-29-4500-9>
- 30 - Yu, C., Jiang, W., Li, B., Hu, Y., & Liu, D. (2023). The Role of Integrins for Mediating Nanodrugs to Improve Performance in Tumor Diagnosis and Treatment. *Nanomaterials*, 13(11), Article 1721. <https://doi.org/10.3390/nano13111721>
- 31 - Zeisel, M. B., Druet, V. A., Sibilia, J., Klein, J. P., Quesniaux, V., & Wachsmann, D. (2005). Cross talk between MyD88 and focal adhesion kinase pathways. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 174(11), 7393–7397. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.11.7393>

- 32 - Wu, C., & Dedhar, S. (2001). Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors: a new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes. *The Journal of cell biology*, 155(4), 505–510. <https://doi.org/10.1083/jcb.200108077>
- 33 - Mezu-Ndubuisi, O. J., & Maheshwari, A. (2021). The role of integrins in inflammation and angiogenesis. *Pediatric research*, 89(7), 1619–1626. <https://doi.org/10.1038/s41390-020-01177-9>
- 34 - Li, Y., Peng, S., Xu, J., Liu, W., & Luo, Q. (2025). Integrin signaling in tumor biology: mechanisms of intercellular crosstalk and emerging targeted therapies. *PeerJ*, 13, e19328. <https://doi.org/10.7717/peerj.19328>
- 35 - Shi, H., & Shao, B. (2023). LFA-1 activation in T-cell migration and immunological synapse formation. *Cells*, 12(8), Article 1136. <https://doi.org/10.3390/cells12081136>
- 36 - Wu, J., Wu, H., An, J., Ballantyne, C. M., & Cyster, J. G. (2018). Critical role of integrin CD11c in splenic dendritic cell capture of missing-self CD47 cells to induce adaptive immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(26), 6786–6791. <https://doi.org/10.1073/pnas.1805542115>
- 37 - Dupuy, A. G., & Caron, E. (2008). Integrin-dependent phagocytosis: spreading from microadhesion to new concepts. *Journal of cell science*, 121(11), 1773–1783. <https://doi.org/10.1242/jcs.018036>
- 38 - Roberts, A. I., Brolin, R. E., & Ebert, E. C. (1999). Integrin alpha1beta1 (VLA-1) mediates adhesion of activated intraepithelial lymphocytes to collagen. *Immunology*, 97(4), 679–685. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1999.00812.x>
- 39 - Andreasen, S. Ø., Thomsen, A. R., Kotliansky, V. E., Novobrantseva, T. I., Sprague, A. G., de Fougères, A. R., & Christensen, J. P. (2003). Expression and functional importance of collagen-binding integrins, alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1, on virus-activated T cells. *Journal of immunology*, 171(6), 2804–2811. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.6.2804>
- 40 - Kriegelstein, C. F., Cerwinka, W. H., Sprague, A. G., Laroux, F. S., Grisham, M. B., Kotliansky, V. E., Senninger, N., Granger, D. N., & de Fougères, A. R. (2002). Collagen-binding integrin alpha1beta1 regulates intestinal inflammation in experimental colitis. *The Journal of clinical investigation*, 110(12), 1773–1782. <https://doi.org/10.1172/JCI15256>
- 41 - Gardner H. (2014). Integrin $\alpha 1\beta 1$. *Advances in experimental medicine and biology*, 819, 21–39. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9153-3_2
- 42 - Boudko, S. P., Konopka, E. H., Kim, W., Taga, Y., Mizuno, K., Springer, T. A., Hudson, B. G., Moy, T. I., & Lin, F. Y. (2023). A recombinant technique for mapping functional sites of heterotrimeric collagen helices: Collagen IV CB3 fragment as a prototype for integrin binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 299(7), Article 104901. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.104901>

- 43 - Senger, D. R., Perruzzi, C. A., Streit, M., Koteliansky, V. E., de Fougerolles, A. R., & Detmar, M. (2002). The alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) integrins provide critical support for vascular endothelial growth factor signaling, endothelial cell migration, and tumor angiogenesis. *The American journal of pathology*, 160(1), 195–204.
[https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64363-5](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64363-5)
- 44 - Becker, H. M., Rullo, J., Chen, M., Ghazarian, M., Bak, S., Xiao, H., Hay, J. B., & Cybulsky, M. I. (2013). $\alpha 1\beta 1$ integrin-mediated adhesion inhibits macrophage exit from a peripheral inflammatory lesion. *Journal of immunology*, 190(8), 4305–4314.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202097>
- 45 - Goldstein, I., Ben-Horin, S., Li, J., Bank, I., Jiang, H., & Chess, L. (2003). Expression of the alpha1beta1 integrin, VLA-1, marks a distinct subset of human CD4+ memory T cells. *The Journal of clinical investigation*, 112(9), 1444–1454. <https://doi.org/10.1172/JCI19607>
- 46 - McComb, S., Thiriot, A., Akache, B., Krishnan, L., & Stark, F. (2019). Introduction to the Immune System. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 2024, 1–24.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9597-4_1
- 47 - Thaiss, C. A., Semmling, V., Franken, L., Wagner, H., & Kurts, C. (2011). Chemokines: A new dendritic cell signal for T cell activation. *Frontiers in Immunology*, 2, Article 31.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00031>
- 48 - Morante-Palacios, O., Fondelli, F., Ballestar, E., & Martínez-Cáceres, E. M. (2021). Tolerogenic Dendritic Cells in Autoimmunity and Inflammatory Diseases. *Trends in immunology*, 42(1), 59–75. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.11.001>
- 49 - Mbongue, J., Nicholas, D., Firek, A., Langridge, W. (2014). The role of dendritic cells in tissue-specific autoimmunity. *Journal of Immunology Research*, 2014, Article 857143.
<https://doi.org/10.1155/2014/857143>
- 50 - Wang, Y., Xiang, Y., Xin, V. W., Wang, X. W., Peng, X. C., Liu, X. Q., Wang, D., Li, N., Cheng, J. T., Lyv, Y. N., Cui, S. Z., Ma, Z., Zhang, Q., & Xin, H. W. (2020). Dendritic cell biology and its role in tumor immunotherapy. *Journal of Hematology & Oncology*, 13(1), Article 107. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00939-6>
- 51 - Spriell, A., & Jong, E. (2012). Dendritic cell science: More than 40 years of history. *Journal of leukocyte biology*. 93. [10.1189/jlb.0512263](https://doi.org/10.1189/jlb.0512263).
- 52 - Kapsenberg M. L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature reviews. Immunology*, 3(12), 984–993. <https://doi.org/10.1038/nri1246>
- 53 - Wehr, P., Purvis, H., Law, S. C., & Thomas, R. (2019). Dendritic cells, T cells and their interaction in rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental immunology*, 196(1), 12–27.
<https://doi.org/10.1111/cei.13256>
- 54 - Hajishengallis, G., & Lambris, J. D. (2016). More than complementing Tolls: complement-Toll-like receptor synergy and crosstalk in innate immunity and inflammation. *Immunological reviews*, 274(1), 233–244. <https://doi.org/10.1111/imr.12467>

- 55 - Alhamdan, F., Bayarsaikhan, G., & Yuki, K. (2024). Toll-like receptors and integrins crosstalk. *Frontiers in Immunology*, 15, Article 1403764. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1403764>
- 56 - Hernández, J., C., Montoya, C., J., & Urcuqui-Inchima, S. (2007). Papel de los receptores tipo toll en las infecciones virales: el VIH-1 como modelo. *Biomédica*, 27(2), 280-293. Recuperado en 01 de febrero de 2026, de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572007000200015&lng=es&tlng=es.
- 57 - Duan, T., Du, Y., Xing, C., Wang, H. Y., & Wang, R. F. (2022). Toll-like receptor signaling and its role in cell-mediated immunity. *Frontiers in Immunology*, 13, Article 812774. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.812774>
- 58 - Cai, C. W., Eickhoff, C. S., Meza, K. A., Blase, J. R., Audette, R. E., Chan, D. H., Bockerstett, K. A., DiPaolo, R. J., & Hoft, D. F. (2021). Th17 Cells Provide Mucosal Protection against Gastric *Trypanosoma cruzi* Infection. *Infection and immunity*, 89(7), e0073820. <https://doi.org/10.1128/IAI.00738-20>
- 59 - Schittenhelm, L., Hilkens, C. M., & Morrison, V. L. (2017). β 2 integrins as regulators of dendritic cell, monocyte, and macrophage function. *Frontiers in Immunology*, 8, Article 1866. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01866>
- 60 - Puig-Kröger, A., Sanz-Rodríguez, F., Longo, N., Sánchez-Mateos, P., Botella, L., Teixidó, J., Bernabéu, C., & Corbí, A. L. (2000). Maturation-dependent expression and function of the CD49d integrin on monocyte-derived human dendritic cells. *Journal of immunology*, 165(8), 4338–4345. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.8.4338>
- 61 - Jain, P., Coisne, C., Enzmann, G., Rottapel, R., & Engelhardt, B. (2010). Alpha4beta1 integrin mediates the recruitment of immature dendritic cells across the blood-brain barrier during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology*, 184(12), 7196–7206. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901404>
- 62 - Harjunpää, H., Somermäki, R., Saldo Rubio, G., Fusciello, M., Feola, S., Faisal, I., Nieminen, A. I., Wang, L., Llorca Asens, M., Zhao, H., Eriksson, O., Cerullo, V., & Fagerholm, S. C. (2024). Loss of β 2-integrin function results in metabolic reprogramming of dendritic cells, leading to increased dendritic cell functionality and anti-tumor responses. *Oncotmmunology*, 13(1), Article 2369373. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2024.2369373>
- 63 - Guenther, C., Faisal, I., Fusciello, M., Sokolova, M., Harjunpää, H., Ilander, M., Tallberg, R., Vartiainen, M. K., Alon, R., Gonzalez-Granado, J. M., Cerullo, V., & Fagerholm, S. C. (2021). β 2-Integrin Adhesion Regulates Dendritic Cell Epigenetic and Transcriptional Landscapes to Restrict Dendritic Cell Maturation and Tumor Rejection. *Cancer immunology research*, 9(11), 1354–1369. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-21-0094>
- 64 - Pribila, J. T., Itano, A. A., Mueller, K. L., & Shimizu, Y. (2004). The alpha 1 beta 1 and alpha E beta 7 integrins define a subset of dendritic cells in peripheral lymph nodes with unique adhesive and antigen uptake properties. *Journal of immunology*, 172(1), 282–291. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.1.282>

65 - Hsu, Chun-Chieh & Chuang, Woei-Jer & Chung, Ching-Hu & Chang, Chien-Hsin & Peng, Hui-Chin & Huang, Tur-Fu. (2016). Snake Venom Disintegrin Inhibits the Activation of Toll-Like Receptors and Alleviates Sepsis through Integrin alphaVbeta3 Blockade. *Scientific Reports*, 6, 23387. [10.1038/srep23387](https://doi.org/10.1038/srep23387).

66 - Luchini, L. S. G., Pidde, G., Squaiella-Baptistão, C. C., & Tambourgi, D. V. (2019). Complement system inhibition modulates the pro-inflammatory effects of a snake venom metalloproteinase. *Frontiers in Immunology*, 10, Article 1137. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01137>

67 - Tanaka, G. D., Pidde-Queiroz, G., de Fátima D Furtado, M., van den Berg, C., & Tambourgi, D. V. (2012). Micurus snake venoms activate human complement system and generate anaphylatoxins. *BMC Immunology*, 13, Article 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-13-4>

68 - Cavalcante, J. S., de Almeida, D. E. G., Santos-Filho, N. A., Sartim, M. A., de Almeida Baldo, A., Brasileiro, L., Albuquerque, P. L., Oliveira, S. S., Sachett, J. A. G., Monteiro, W. M., & Ferreira, R. S., Jr. (2023). Crosstalk of inflammation and coagulation in Bothrops snakebite envenoming: Endogenous signaling pathways and pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14), Article 11508. <https://doi.org/10.3390/ijms241411508>

69 - Avalo, Z., Barrera, M. C., Agudelo-Delgado, M., Tobón, G. J., & Cañas, C. A. (2022). Biological effects of animal venoms on the human immune system. *Toxins*, 14(5), Article 344. <https://doi.org/10.3390/toxins14050344>

70 - Alvarez-Flores, M. P., Correia Batista, I. F., Villas Boas, I. M., Bufalo, M. C., de Souza, J. G., Oliveira, D. S., Bonfá, G., Fernandes, C. M., Marques Porto, R., Lichtenstein, F., Pícolo, G., Tambourgi, D. V., Chudzinski-Tavassi, A. M., Ibañez, O. C. M., & Teixeira, C. (2024). Snake and arthropod venoms: Search for inflammatory activity in human cells involved in joint diseases. *Toxicon*, 238, Article 107568. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2023.107568>

71 - Giannotti, K. C., Leiguez, E., Carvalho, A. E. Z., Nascimento, N. G., Matsubara, M. H., Fortes-Dias, C. L., Moreira, V., & Teixeira, C. (2017). A snake venom group IIA PLA2 with immunomodulatory activity induces formation of lipid droplets containing 15-d-PGJ2 in macrophages. *Scientific Reports*, 7(1), Article 4098. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04498-8>

72 - Teixeira, D. S., Maia-Marques, R., & Teixeira, C. (2025). *Crotalus durissus terrificus* snake venom activates 3T3-L1 preadipocytes to release PGE2, which depends on COX-2 expression and is modulated by PGE2 EP2 receptor. *Archives of toxicology*, 99(10), 4281–4289. <https://doi.org/10.1007/s00204-025-04109-w>

73 - Halm, Derek. (2024). Neglected Tropical Diseases and Long-Term Captive Animals: Ethical Considerations with Venom Lab Snakes. *Journal of Applied Animal Ethics Research*, 6, 1-22. [10.1163/25889567-bja10049](https://doi.org/10.1163/25889567-bja10049).

74 - Angarita-Sierra, T., Torres-Ramírez, J., Castro, C., Sarmiento-Pérez, M., & Ruiz-Gómez, F. (2024). Serpientes venenosas en cautiverio: Una historia de lecciones aprendidas. In T.

Angarita-Sierra & F. Ruiz (Eds.), Mordeduras, venenos y serpientes venenosas de Colombia (pp.373-410). <https://doi.org/10.33610/236047mxrfid>.

75 - Terpe K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(2), 211–222. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0465-8>

76 - Rivera-de-Torre, E., Rimbault, C., Jenkins, T. P., Sørensen, C. V., Damsbo, A., Saez, N. J., Duhoo, Y., Hackney, C. M., Ellgaard, L., & Laustsen, A. H. (2022). Strategies for heterologous expression, synthesis, and purification of animal venom toxins. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, Article 811905. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.811905>

77 - David, V., Succar, B. B., de Moraes, J. A., Saldanha-Gama, R. F. G., Barja-Fidalgo, C., & Zingali, R. B. (2018). Recombinant and chimeric disintegrins in preclinical research. *Toxins*, 10(8), Article 321. <https://doi.org/10.3390/toxins10080321>

78 - de Marco, A. (2025). Recent advances in recombinant production of soluble proteins in *E. coli*. *Microbial Cell Factories*, 24(1), Article 21. <https://doi.org/10.1186/s12934-025-02646-8>

79 - Roman-Ramos, H., & Ho, P. L. (2024). Current technologies in snake venom analysis and applications. *Toxins*, 16(11), Article 458. <https://doi.org/10.3390/toxins16110458>

80 - Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., & Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(12), 5301–5317. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5732-5>

81 - Jia, L. G., Wang, X. M., Shannon, J. D., Bjarnason, J. B., & Fox, J. W. (1997). Function of disintegrin-like/cysteine-rich domains of atrolysin A: Inhibition of platelet aggregation by recombinant protein and peptide antagonists. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(20), 13094–13102. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.20.13094>

82 - Korn, J., Schäckermann, D., Kirmann, T., Bertoglio, F., Steinke, S., Heisig, J., Ruschig, M., Rojas, G., Langreder, N., Wenzel, E., Roth, K., Becker, M., Meier, D., Heuvel, J., Hust, M., Dübel, S., & Schubert, M. (2020). Baculovirus-free insect cell expression system for high yield antibody and antigen production. *Scientific Reports*, 10, Article 78425. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78425-9>.

83 - Misson Mindrebo, L. E., Mindrebo, J. T., Tran, Q., Wilkinson, M. C., Smith, J. M., Verma, M., Casewell, N. R., Lander, G. C., & Jardine, J. G. (2024). Importance of the Cysteine-Rich Domain of Snake Venom Prothrombin Activators: Insights Gained from Synthetic Neutralizing Antibodies. *Toxins*, 16(8), 361. <https://doi.org/10.3390/toxins16080361>

84 - Menezes, M. C., Imbert, L., Kitano, E. S., Vernet, T., & Serrano, S. M. (2016). Recombinant expression of the precursor of the hemorrhagic metalloproteinase HF3 and its non-catalytic domains using a cell-free synthesis system. *Amino Acids*, 48(9), 2205–2214. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2255-7>

- 85 - Dalla Rizza, J., Ortega, C., Carrión, F., Fló, M., & Correa, A. (2022). Production, purification, and characterization of a double-tagged TEV protease. *Protein Expression and Purification*, 191, 106021. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.106021>
- 86 - Ortega, C., Prieto, D., Abreu, C., Oppedo, P., & Correa, A. (2018). Multi-compartment and multi-host vector suite for recombinant protein expression and purification. *Frontiers in Microbiology*, 9, Article 1384. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01384>
- 87 - Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- 88 - Blum, H., Beier, H., & Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8(2), 93–99. <https://doi.org/10.1002/elps.1150080203>
- 89 - Eble, J. A., Beermann, B., Hinz, H. J., & Schmidt-Hederich, A. (2001). Alpha 2beta 1 integrin is not recognized by rhodocytin but is the specific, high-affinity target of rhodocetin, an RGD-independent disintegrin and potent inhibitor of cell adhesion to collagen. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(15), 12274–12284. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009338200>
- 90 - Tait Wojno, E. D., Hunter, C. A., & Stumhofer, J. S. (2019). The immunobiology of the interleukin-12 family: Room for discovery. *Immunity*, 50(4), 851–870. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.011>
- 91 - Grebenciucova, E., & VanHaerents, S. (2023). Interleukin 6: At the interface of human health and disease. *Frontiers in Immunology*, 14, Article 1255533. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1255533>
- 92 - Sánchez, E. E., Lucena, S. E., Reyes, S., Soto, J. G., Cantu, E., Lopez-Johnston, J. C., Guerrero, B., Salazar, A. M., Rodríguez-Acosta, A., Galán, J. A., Tao, W. A., & Pérez, J. C. (2010). Cloning, expression, and hemostatic activities of a disintegrin, r-mojastin 1, from the Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*). *Thrombosis Research*, 126(3), e211–e219. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2010.06.006>
- 93 - Haggarty-Weir, C., Galloway, R., & Godfrey, W. (2018). Methods for the refolding of disulfide-rich proteins. *Eureka Methods*. <https://doi.org/10.31109/EurekaMet.e02>
- 94 - Selistre-de-Araujo, H. S., de Souza, E. L., Beltramini, L. M., Ownby, C. L., & Souza, D. H. (2000). Expression, refolding, and activity of a recombinant nonhemorrhagic snake venom metalloprotease. *Protein Expression and Purification*, 19(1), 41–47. <https://doi.org/10.1006/prep.2000.1225>
- 95 - Vasconcelos, A. A., Zingali, R. B., & Almeida, F. C. L. (2025). Surface hydrophobic clusters modulate the folding stability and molecular recognition of the disintegrin jarastatin. *The Journal of Biological Chemistry*, 301(3), Article 108294. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2025.108294>

- 96 - Niwa, T., Ying, B. W., Saito, K., Jin, W., Takada, S., Ueda, T., & Taguchi, H. (2009). Bimodal protein solubility distribution revealed by an aggregation analysis of the entire ensemble of *Escherichia coli* proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(11), 4201–4206. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811922106>
- 97 - Lobstein, J., Emrich, C. A., Jeans, C., Faulkner, M., Riggs, P., & Berkmen, M. (2012). SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. Microbial Cell Factories, 11, Article 56. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-56>
- 98 - Lobstein, J., Emrich, C. A., Jeans, C., Faulkner, M., Riggs, P., & Berkmen, M. (2012). SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. Microbial Cell Factories, 11, 56. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-56>
- 99 - Linova, M. Y., Risør, M. W., Jørgensen, S. E., Mansour, Z., Kaya, J., Sigurdarson, J. J., Enghild, J. J., & Karring, H. (2020). A novel approach for production of an active N-terminally truncated Ulp1 (SUMO protease 1) catalytic domain from *Escherichia coli* inclusion bodies. Protein Expression and Purification, 166, 105507. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.105507>
- 100 - Moraes, A. M., Jorge, S. A., Astray, R. M., Suazo, C. A., Calderón Riquelme, C. E., Augusto, E. F., Tonso, A., Pamboukian, M. M., Piccoli, R. A., Barral, M. F., & Pereira, C. A. (2012). *Drosophila melanogaster* S2 cells for expression of heterologous genes: From gene cloning to bioprocess development. Biotechnology Advances, 30(3), 613–628. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.10.009>
- 101 - Lemos, M. A., Santos, A. S., Astray, R. M., Pereira, C. A., & Jorge, S. A. (2009). Rabies virus glycoprotein expression in *Drosophila* S2 cells. I: Design of expression/selection vectors, subpopulations selection and influence of sodium butyrate and culture medium on protein expression. Journal of Biotechnology, 143(2), 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.07.003>
- 102 - Greenfield, N. J. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. Nature Protocols, 1(6), 2876–2890. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.202>
- 103 - Zheng, W., Zhang, C., Li, Y., Pearce, R., Bell, E. W., & Zhang, Y. (2021). Folding non-homologous proteins by coupling deep-learning contact maps with I-TASSER assembly simulations. Cell Reports Methods, 1(3), 100014. <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2021.100014>
- 104 - Paz Moreno-Murciano, M., Monleón, D., Marcinkiewicz, C., Calvete, J. J., & Celda, B. (2003). NMR solution structure of the non-RGD disintegrin obtustatin. Journal of Molecular Biology, 329(1), 135–145. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00371-1](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00371-1)
- 105 - Atkinson, R. A., Saudek, V., & Pelton, J. T. (1994). Echistatin: The refined structure of a disintegrin in solution by 1H NMR and restrained molecular dynamics. International Journal of Peptide and Protein Research, 43(6), 563–572. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1994.tb00558.x>

- 106 - Zhang, C., Freddolino, L., & Zhang, Y. (2017). COFACTOR: improved protein function prediction by combining structure, sequence and protein-protein interaction information. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W291–W299. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx366>
- 107 - Yang, J., & Zhang, Y. (2015). I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W174–W181. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv342>
- 108 - Yan, K., Liang, J., Zhang, X., Deng, L., Feng, D., & Ling, B. (2019). Polyinosinic-polycytidylic acid induces innate immune responses via Toll-like receptor 3 in human ovarian granulosa cells. *Immunology and Cell Biology*, 97(8), 753–765. <https://doi.org/10.1111/imcb.12269>
- 109 - Chai, Z., Zhou, Y., Yang, L., Zhang, Y., Hossain, S., Hajimirzaei, S., Qi, J., Zhang, G., Wei, Y., & Li, Z. (2025). MyD88 contributes to TLR3-mediated NF- κ B activation and cytokine production in macrophages. *Cells*, 14(19), 1507. <https://doi.org/10.3390/cells14191507>
- 110 - Gilmour, B. C., Corthay, A., & Øynebråten, I. (2024). High production of IL-12 by human dendritic cells stimulated with combinations of pattern-recognition receptor agonists. *NPJ Vaccines*, 9(1), 83. <https://doi.org/10.1038/s41541-024-00869-1>
- 111 - Dillon, S., Agrawal, S., Banerjee, K., Letterio, J., Denning, T. L., Oswald-Richter, K., Kasproicz, D. J., Kellar, K., Pare, J., van Dyke, T., Ziegler, S., Unutmaz, D., & Pulendran, B. (2006). Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(4), 916–928. <https://doi.org/10.1172/JCI27203>
- 112 - Schwarz, H., Schmittner, M., Duschl, A., & Horejs-Hoeck, J. (2014). Residual endotoxin contaminations in recombinant proteins are sufficient to activate human CD1c+ dendritic cells. *PLoS One*, 9(12), e113840. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113840>
- 113 - Cardoso, L. S., Araujo, M. I., Góes, A. M., Pacífico, L. G., Oliveira, R. R., & Oliveira, S. C. (2007). Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis. *Microbial Cell Factories*, 6, 1. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-1>
- 114 - Liu, S., Tobias, R., McClure, S., Styba, G., Shi, Q., & Jackowski, G. (1997). Removal of endotoxin from recombinant protein preparations. *Clinical Biochemistry*, 30(6), 455–463. [https://doi.org/10.1016/s0009-9120\(97\)00049-0](https://doi.org/10.1016/s0009-9120(97)00049-0)
- 115 - Song, J. S., Kim, Y. J., Han, K. U., Yoon, B. D., & Kim, J. W. (2015). Zymosan and PMA activate the immune responses of Mutz3-derived dendritic cells synergistically. *Immunology Letters*, 167(1), 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.07.002>
- 116 - Deifl, S., Kitzmüller, C., Steinberger, P., Himly, M., Jahn-Schmid, B., Fischer, G. F., Zlabinger, G. J., & Bohle, B. (2014). Differential activation of dendritic cells by toll-like receptors causes diverse differentiation of naïve CD4+ T cells from allergic patients. *Allergy*, 69(12), 1602–1609. <https://doi.org/10.1111/all.12501>

117 - Boullart, A. C., Aarntzen, E. H., Verdijk, P., Jacobs, J. F., Schuurhuis, D. H., Benitez-Ribas, D., Schreiber, G., van de Rakt, M. W., Scharenborg, N. M., de Boer, A., Kramer, M., Figdor, C. G., Punt, C. J., Adema, G. J., & de Vries, I. J. (2008). Maturation of monocyte-derived dendritic cells with Toll-like receptor 3 and 7/8 ligands combined with prostaglandin E2 results in high interleukin-12 production and cell migration. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 57(11), 1589–1597.

<https://doi.org/10.1007/s00262-008-0489-2>

118 - Zhong, C., Wang, L., Hu, S., Huang, C., Xia, Z., Liao, J., Yi, W., & Chen, J. (2021). Poly(I:C) enhances the efficacy of phagocytosis checkpoint blockade immunotherapy by inducing IL-6 production. *Journal of leukocyte biology*, 110(6), 1197–1208.

<https://doi.org/10.1002/JLB.5MA0421-013R>

119 - Apostólico, J. S., Lunardelli, V. A. S., Yamamoto, M. M., Cunha-Neto, E., Boscardin, S. B., & Rosa, D. S. (2019). Poly(I:C) potentiates T cell immunity to a dendritic cell targeted HIV-multiepitope vaccine. *Frontiers in Immunology*, 10, Article 843.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00843>

120 - Dearman, R. J., Cumberbatch, M., Maxwell, G., Basketter, D. A., & Kimber, I. (2009). Toll-like receptor ligand activation of murine bone marrow-derived dendritic cells.

Immunology, 126(4), 475–484. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02922.x>

121 - Tiniakou, I., Drakos, E., Sinatkas, V., Van Eck, M., Zannis, V. I., Boumpas, D., Verginis, P., & Kardassis, D. (2015). High-density lipoprotein attenuates Th1 and Th17 autoimmune responses by modulating dendritic cell maturation and function. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 194(10), 4676–4687. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402870>

122 - Schüller, S., Wisgrill, L., Sadeghi, K. et al. The TLR-specific adjuvants R-848 and CpG-B endorse the immunological reaction of neonatal antigen-presenting cells. (2016). *Pediatr Res* 80, 311–318. <https://doi.org/10.1038/pr.2016.71>

123 - Clemens, E. A., Holbrook, B. C., McNeilly, B., Kanekiyo, M., Graham, B. S., & Alexander-Miller, M. A. (2022). TLR agonists induce sustained IgG to hemagglutinin stem and modulate T cells following newborn vaccination. *NPJ Vaccines*, 7(1), 102.

<https://doi.org/10.1038/s41541-022-00523-8>

124 - Ananya, A., Holden, K. G., Gu, Z., Nettleton, D., Mallapragada, S. K., Wannemuehler, M. J., Kohut, M. L., & Narasimhan, B. (2023). "Just right" combinations of adjuvants with nanoscale carriers activate aged dendritic cells without overt inflammation. *Immunity & Ageing*, 20, 10. <https://doi.org/10.1186/s12979-023-00332-0>

125 - Chung, K. J., Mitroulis, I., Wiessner, J. R., Zheng, Y. Y., Siegert, G., Sperandio, M., & Chavakis, T. (2014). A novel pathway of rapid TLR-triggered activation of integrin-dependent leukocyte adhesion that requires Rap1 GTPase. *Molecular biology of the cell*, 25(19), 2948–2955. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-04-0867>

126 - Yee, N. K., & Hamerman, J. A. (2013). $\beta(2)$ integrins inhibit TLR responses by regulating NF- κ B pathway and p38 MAPK activation. *European journal of immunology*, 43(3), 779–792. <https://doi.org/10.1002/eji.201242550>

127 - Kon, S., & Uede, T. (2018). The role of $\alpha 9\beta 1$ integrin and its ligands in the development of autoimmune diseases. *Journal of cell communication and signaling*, 12(1), 333–342. <https://doi.org/10.1007/s12079-017-0413-7>