



Universidad de la República
Facultad de Ciencias

Tesina de grado de Licenciatura en Bioquímica

**Generación de un ensayo de ELISA para hTL1A,
utilizando *nanobodies*, como una herramienta para
el diagnóstico y el seguimiento de diferentes
enfermedades autoinmunes e inflamatorias.**

Noelia Silva Pilipich

Tutora: Dra. Lucía Vanrell Majó

Co-tutor: Dr. Gualberto González Sapienza

Cátedra de Inmunología, Instituto de Higiene, Facultad de Química

Montevideo, Uruguay

Julio 2015

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, Lucía, por sus muchas horas de dedicación, sus enseñanzas, y también por su cariño.

A mi co-tutor, Gualberto, por permitirme ingresar al laboratorio y por estar siempre pendiente del trabajo, aportando sus ideas.

A mis padres, por su constante apoyo y por darme todas las oportunidades para alcanzar esta meta.

A Cove, por compartir éxitos y fracasos y por siempre animarme a seguir.

A las amigas de siempre (Monas) porque son el ejemplo del esfuerzo, la dedicación y la locura.

A las amigas de la carrera (Glendas) por compartir mucho más que horas de estudio, y por ser mucho más que colegas.

A las amigas Geos y Bios que conocí en el primer año de Facultad.

A todos los compañeros de la Cátedra de Inmunología, especialmente a los de la “casita del fondo” por su incansable disposición para ayudar y por el buen ambiente de trabajo.

A la ANII por otorgarme la beca de Iniciación a la investigación.

RESUMEN

En la actualidad, muchas de las enfermedades autoinmunes o autoinflamatorias crónicas carecen de suficientes biomarcadores para su diagnóstico o el seguimiento de su evolución, por lo que el establecimiento de tratamientos adecuados para cada paciente y el pronóstico de los mismos se ven afectados.

TL1A (*TNF-like ligand 1 A*) es un miembro de la superfamilia del TNF recientemente caracterizado, cuyos niveles elevados en suero se han asociado a diversas patologías humanas de carácter autoinmune e inflamatorio crónico. TL1A juega un papel importante en la activación de las células T, potenciando especialmente las respuestas Th1 y Th17, por lo que se ha reportado que puede agravar la sintomatología de enfermedades autoinmunes. El mecanismo por el cual TL1A está involucrado en la inmunopatogenia de enfermedades autoinflamatorias aún no está esclarecido. Los niveles séricos de TL1A se correlacionan con la actividad de enfermedades como la artritis reumatoide y la espondilitis anquilosante, por lo que se lo ha propuesto como un indicador de actividad de las mismas. TL1A ha sido estudiado en relación a su rol en distintas enfermedades en los últimos años, sin embargo actualmente no existen ensayos disponibles para la cuantificación del mismo de forma rutinaria en la clínica. En el presente trabajo se generó un ensayo de ELISA para hTL1A basado en la utilización de *nanobodies* (anticuerpos de

cadena pesada de llama: *Lama glama*), los cuales presentan numerosas ventajas con respecto a los anticuerpos convencionales (manipulación genética sencilla, facilidad y bajos costos de producción, elevada estabilidad fisicoquímica). El ensayo desarrollado presenta un límite de detección similar al de los kits comerciales disponibles para investigación, con la ventaja adicional de que muestra un rango lineal muy adecuado para la cuantificación de TL1A en muestras séricas humanas, propiedad que no presentan los kits comerciales. Próximamente se espera poder validar el ensayo utilizando muestras de sueros de pacientes con artritis reumatoide o espondilitis anquilosante, y en el caso de obtener buenos resultados este ensayo podría implementarse en laboratorios clínicos y ser utilizado en conjunto con los métodos convencionales de diagnóstico de estas enfermedades y como un indicador de actividad de las mismas.

Palabras clave

Inmunoensayo tipo ELISA

TL1A

Enfermedades autoinmunes

Enfermedades autoinflamatorias crónicas

VHHs o *nanobodies*

Bibliotecas de anticuerpos

Phage display

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

aas	Aminoácidos
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AIA	Artritis inducida por antígeno
AR	Artritis reumatoide
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
APC	Célula presentadora de antígeno
AP-1	Proteína activadora 1
BCR	Receptor de célula B
BMDC	Del inglés: <i>bone marrow-derived cell</i>
BSA	Seroalbúmina bovina
CABLV	Proteína de cápside del virus de la leucosis bovina
CCP	Proteína citrulinada cíclica
CD	Del inglés: <i>cluster of differentiation</i>
CD40L	Del inglés: <i>cluster of differentiation 40 ligand</i>
CDR	Región determinante de complementariedad
CIA	Artritis inducida por colágeno

c-IAP	Del inglés: <i>cellular inhibitor of apoptosis protein</i>
CRD	Dominio repetido de cisteínas
Ct	Extremo carboxilo-terminal de un péptido o proteína
CU	Colitis ulcerosa
Da	Dalton (unidad de masa atómica)
DcR3	Del inglés: <i>decoy receptor 3</i>
DD	Dominio de muerte
DLG	Del inglés: <i>disks large homolog</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
DR3	Del inglés: <i>death receptor 3</i>
DSS	Dextrán sulfato de sodio
DTT	Ditiotreitol
EA	Espondilitis anquilosante
EAE	Encefalomiелitis autoinmune experimental
EC	Enfermedad de Crohn
EC50	Concentración de analito con la cual se alcanza el 50% de la señal máxima del ensayo
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético

ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
FADD	Del inglés: <i>Fas-associated death domain</i>
FasL	Del inglés: <i>Fas ligand</i>
FR	Del inglés: <i>framework region</i>
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
HA	Epítotope de hemaglutinina
hPD1	Del inglés: <i>human programmed death receptor 1</i>
hPDL1	Del inglés: <i>human programmed death ligand 1</i>
HRP o PO	Peroxidasa de rábano
IBD	Enfermedades inflamatorias intestinales
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactósido
KO	Del inglés: <i>knock out</i>
LB	Medio Luria-Bertani
LD	Límite de detección
LDL	Del inglés: <i>low density lipoproteins</i>
LES	Lupus eritematoso sistémico
LIGHT	Del inglés: <i>lymphotoxin-related inducible ligand that competes for glycoprotein D binding to herpesvirus entry mediator on T cells</i>

LPS	Lipopolisacárido
LT	Linfotoxina
MAPK	Del inglés: <i>mitogen-activated protein kinases</i>
MMPs	Metaloproteinasas de matriz
MOPS	Ácido 3-(n-morfolino)-propanosulfónico
NF-κB	Del inglés: <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	Del inglés: <i>natural killer cells</i>
NKT	Del inglés: <i>natural killer T lymphocyte</i>
NOD	Del inglés: <i>nucleotide oligomerization domain</i>
Nt	Extremo amino-terminal de un péptido o proteína
OCTN	Del inglés: <i>organic cation transporter</i>
OmpA	Del inglés: <i>Outer membrane protein A</i>
ON	Del inglés: <i>overnight</i>
OPD	O-fenilendiamina
OVA	Ovoalbúmina
PBS	Buffer fosfato salino
PBS-T	Buffer fosfato salino adicionado con Tween 20 al 0,05%
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
pfu	Unidades formadoras de placa

PI3K	Fosfatidilinositol-3 quinasa
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones moleculares
RANKL	Del inglés: <i>receptor activator for nuclear factor κB ligand</i>
RBS	Sitio de unión del ribosoma
RF	Factor reumatoideo
RIP	Del inglés: <i>receptor-interacting protein</i>
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa
SB	Del inglés: <i>super broth</i>
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SOC	Del inglés: <i>super optimal broth with catabolite repression</i>
S-PO	Estreptavidina asociada a la peroxidasa
STAT	Del inglés: <i>signal transducer and activator of transcription</i>
TACE	Del inglés: <i>tumor necrosis factor-α-converting enzyme</i>
TCC	Triclocarbán
TCR	Receptor de linfocitos T
TGF-β	Del inglés: <i>transforming growth factor β</i>
TLR	Receptor tipo Toll
TL1A	Del inglés: <i>TNF-like ligand 1 A</i>

TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFR	Receptores de la familia del TNF
TNFSF	Superfamilia del factor de necrosis tumoral
TRADD	Del inglés: <i>TNFR-associated death domain</i>
TRAF	Del inglés: <i>TNFR-associated factor</i>
TRAIL	Del inglés: <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
Tregs	Células T reguladoras
U	Unidades
UA	Unidad de absorbancia
UTR	Del inglés: <i>untranslated region</i>
VEGI	Del inglés: <i>vascular endothelial cell-growth inhibitor</i>
VHH	Dominio amino-terminal de los anticuerpos de cadena pesada de camélidos
VHH-biot	VHH asociado a una molécula de biotina
WT	Del inglés: <i>wild type</i>

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	TL1A: MIEMBRO DE LA SUPERFAMILIA DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL	1
1.2	TL1A: ESTRUCTURA Y EXPRESIÓN	4
1.3	RECEPTORES PARA TL1A: DR3 Y DCR3	8
1.4	VÍA DE SEÑALIZACIÓN TL1A-DR3	12
1.4.1	<i>Células T CD4⁺</i>	14
1.4.2	<i>Células T CD8⁺</i>	19
1.4.3	<i>Células B</i>	20
1.4.4	<i>Células NK y NKT</i>	21
1.5	VÍA TL1A-DR3 EN AUTOINMUNIDAD E INFLAMACIÓN	22
1.5.1	<i>Artritis reumatoide</i>	24
1.5.2	<i>Enfermedad de Crohn</i>	35
1.6	VHHS: CARACTERÍSTICAS Y VENTAJAS PARA SU UTILIZACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA	43
1.7	OBJETIVOS	48
1.7.1	<i>Objetivo general</i>	49
1.7.2	<i>Objetivos específicos</i>	50
2	MATERIALES Y METODOS	51
2.1	BUFFERS Y SOLUCIONES	51

2.2	MEDIOS DE CULTIVO	52
2.3	INMUNIZACIÓN DE LLAMA Y GENERACIÓN DE BIBLIOTECA.....	53
2.4	<i>PANNINGS</i>	57
2.4.1	<i>Amplificación de los outputs</i>	58
2.4.2	<i>Titulación de los outputs</i>	59
2.4.3	<i>Rondas de panning y screening de clones específicos para TL1A</i>	60
2.5	CLONAJE DEL <i>OUTPUT</i> DEL <i>PANNING</i> A VECTORES DE EXPRESIÓN	62
2.5.1	<i>Vector pINQ-OmpA</i>	63
2.5.2	<i>Vector pINQ-BtH6</i>	64
2.5.3	<i>Clonaje del output de la ronda de panning 2C a vectores de expresión</i>	66
2.5.4	<i>Clonaje de VHHs individuales a vectores de expresión</i>	68
2.6	EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE VHHs	71
2.6.1	<i>Producción de VHHs biotinilados</i>	71
2.6.2	<i>Producción de VHHs biotinilados en bloques de cultivo</i>	72
2.6.3	<i>Producción de VHHs sin biotinar</i>	73
2.6.4	<i>Producción de VHHs sin biotinar en bloques de cultivo</i>	74
2.6.5	<i>Purificación de VHHs producidos a gran escala</i>	74
2.6.6	<i>Purificación de VHHs producidos a pequeña escala</i>	76
2.7	RANKING DE AFINIDADES.....	77
2.7.1	<i>Ensayo de saturación</i>	77
2.7.2	<i>Conjugación de TL1A a la peroxidasa</i>	78

2.7.3	<i>Titulación de TL1A-peroxidasa</i>	79
2.7.4	<i>Comparación de afinidades de los distintos clones en ELISA.</i>	80
2.8	ELISA SÁNDWICH PARA TL1A.....	81
2.9	APROXIMACIÓN A LA VALIDACIÓN DEL ENSAYO DE ELISA PARA TL1A GENERADO UTILIZANDO UN KIT COMERCIAL	84
2.10	TRATAMIENTO DE DATOS.....	85
3	RESULTADOS	86
3.1	SELECCIÓN DE VHHS ESPECÍFICOS POR TL1A	86
3.2	CLONAJE DE VHHS ANTI-TL1A A VECTORES DE EXPRESIÓN PROCARIOTAS.....	91
3.3	ENSAYO DE RANKING DE AFINIDADES.....	93
3.4	PRIMERA APROXIMACIÓN A UN ELISA TIPO SÁNDWICH PARA TL1A	103
3.5	CAMBIO DE FORMATO DEL ENSAYO DE ELISA: ESTUDIO DEL EFECTO DE LA PROTEÍNA DE <i>COATING</i>	107
3.6	<i>SCREENING</i> DE POTENCIALES VHHS DE DETECCIÓN EXPRESADOS A PARTIR DEL VECTOR PINQ-OMPA.....	110
3.7	OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO DE ELISA PARA TL1A EN PBS-BSA.....	118
3.8	OTRO FORMATO POSIBLE DE ELISA PARA TL1A: USO DE ESTREPTAVIDINA-PEROXIDASA PARA LA DETECCIÓN	124
3.8.1	<i>Formato con anticuerpos invertidos</i>	126
3.8.2	<i>Cambio de tags de los VHHS utilizados en ensayo</i>	129
3.8.3	<i>Desarrollo de ELISA sándwich para TL1A utilizando S-PO</i>	132

3.9	DETECCIÓN DE TL1A EN SUERO COMERCIAL HUMANO A PARTIR DEL ENSAYO DE ELISA GENERADO	135
3.10	EXPLORACIÓN DE POTENCIALES VHHS DE CAPTURA Y SU COMPORTAMIENTO FRENTE A LA EXPOSICIÓN AL SUERO COMERCIAL HUMANO	142
3.11	OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO DE ELISA DESARROLLADO UTILIZANDO SUERO COMERCIAL HUMANO COMO MATRIZ.....	145
3.12	COMPARACIÓN DEL ENSAYO DE ELISA GENERADO CON EL ENSAYO COMERCIAL	148
4	DISCUSION	154
4.1	PERSPECTIVAS A FUTURO	161
5	GLOSARIO	165
6	REFERENCIAS	171

1 INTRODUCCIÓN

1.1 TL1A: miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral

TL1A (del inglés: *TNF-like ligand 1 A*) es un miembro de la superfamilia del TNF recientemente caracterizado, que se ha relacionado con diversas enfermedades humanas de carácter autoinmune e inflamatorio. Su receptor, DR3 (del inglés: *death receptor 3*), pertenece a la superfamilia de receptores de TNF (TNFRSF).

Los miembros que conforman la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNFSF) están implicados en la regulación de muchos procesos biológicos importantes como desarrollo, organogénesis y respuestas del sistema inmune innato y adaptativo. Hasta la fecha se han identificado 19 ligandos y 29 receptores de esta superfamilia (Aggarwal et al., 2012).

Dentro de los ligandos se encuentran moléculas conocidas como TNF- α , TNF- β , LT β , CD27L, CD30L, CD40L, 4-1BBL, FasL, OX40L, TRAIL y TL1A. Estas citoquinas son proteínas de membrana de tipo II, a excepción del TNF- β que se halla en forma soluble. Además, algunas pueden presentar las dos isoformas por procesamiento proteolítico de las formas transmembrana, como es el caso del TNF- α y TL1A (Aggarwal et al., 2012). Los miembros de la familia del TNF presentan relativamente baja conservación de secuencias, siendo la homología entre las distintas

moléculas de 15 a 34% en los dominios extracelulares (región C-terminal) (Tan et al., 1997).

Los receptores, en cambio, son proteínas transmembrana de tipo I y presentan una alta homología estructural y de secuencias, siendo algunos ejemplos TNFR-I, TNFR-II, TNFR-III, CD27, CD30, CD40, 4-1BB, Fas, OX40, LNGFR y DR3 (Tan et al., 1997). Pueden dividirse en dos grupos dependiendo del dominio intracelular que presentan. El grupo I, dentro del cual se encuentra DR3 (receptor de TL1A), presenta un dominio globular de unos 60 aminoácidos denominado dominio de muerte (DD), y el grupo II presenta dominios de unión a proteínas adaptadoras denominadas TRAFs. La señalización vía el DD se da por medio de las proteínas adaptadoras FADDs y TRADDs, y en ocasiones también vía TRAFs, las cuales pueden unirse directamente a la región citosólica del receptor o a TRADDs. La señalización por medio de FADDs y TRADDs, es decir a través del DD, provoca en general la muerte celular por apoptosis debido a la activación de caspasas, mientras que la señalización vía TRAFs puede llevar a la activación de distintos factores de transcripción como NF- κ B y AP-1, los cuales inducen genes de supervivencia y proliferación. El balance entre las señales provenientes de la propia célula y del ambiente pueden modificar la actividad funcional de los TNFR y de esta manera determinar el destino celular (Slebioda and Kmiec, 2014). En algunos casos los receptores también pueden ser encontrados en forma

soluble por empalme alternativo, como en el caso de Fas (Cascino et al., 1995).

Las interacciones TNF-TNFR son capaces de regular las respuestas de células T y la comunicación de las mismas con otros tipos celulares, modulando las respuestas inmunes. Dentro de estas interacciones, OX40-OX40L, 4-1BB-4-1BBL, CD27-CD70 y DR3-TL1A han sido las más estudiadas en cuanto a sus efectos sobre las células T. En general ocurren luego de iniciada la respuesta inmune, ya que las células en reposo o activadas recientemente expresan bajos niveles de estas moléculas. Distintos estímulos provocan el aumento en la expresión de ligandos y receptores de la superfamilia del TNF en diferentes células del sistema inmune innato y adaptativo y también en células no inmunes (células endoteliales, células del músculo liso, condrocitos). Los ligandos se expresan en células presentadoras de antígeno profesionales (células dendríticas, macrófagos y linfocitos B) y en células no inmunes. Las células T CD4⁺ y CD8⁺ pueden expresar tanto los receptores como los ligandos, por lo tanto las interacciones entre células T parecerían ser importantes en el desarrollo de respuestas efectoras. Otras células del sistema inmune como células NK, células NKT y células T reguladoras (Tregs) también pueden expresar este tipo de moléculas (Croft, 2009).

La señalización a través de los receptores OX40, 4-1BB, CD27 y DR3 llevan a la expresión de genes anti-apoptóticos que contribuyen a la inflamación, por ejemplo por activación de la vía de NF-κB. En linfocitos T,

la señalización a través de los TNFRs en conjunto con la proveniente del TCR induce la proliferación celular y la producción de citoquinas (IL-2, IL-4, IL-5 e IFN- γ) y de los receptores para las mismas (lo cual aumenta la sensibilidad del linfocito T) (Croft, 2009).

1.2 TL1A: estructura y expresión

TL1A, también conocido como VEGI (del inglés: *vascular endothelial cell-growth inhibitor*), es un miembro de la familia de TNF recientemente caracterizado codificado por el gen TNFSF15, el cual mapea en el cromosoma 9 en humanos (locus 9q32) (Migone et al., 2002). Este gen tiene un tamaño de al menos 17 kb, presentando 4 exones y 3 intrones (Chew et al., 2002). En humanos el gen TNFSF15 da lugar a tres isoformas de la proteína a través de empalme alternativo del ARNm, las cuales poseen diferentes longitudes: 174, 192 y 251 aminoácidos (aas) (fig. 1). TL1A (VEGI-251) se corresponde con el producto del gen completo, y está codificado por los 4 exones que presentan entre ellos secuencias consenso de empalme. VEGI-174 (también conocido como TL1) está codificado únicamente por el exón 4 y la región 5' adyacente no codificante, mientras que la tercer variante (VEGI-192) está codificada por los exones 3 y 4 y la región 5' adyacente no codificante del exón 3 (Slebioda and Kmiec, 2014).

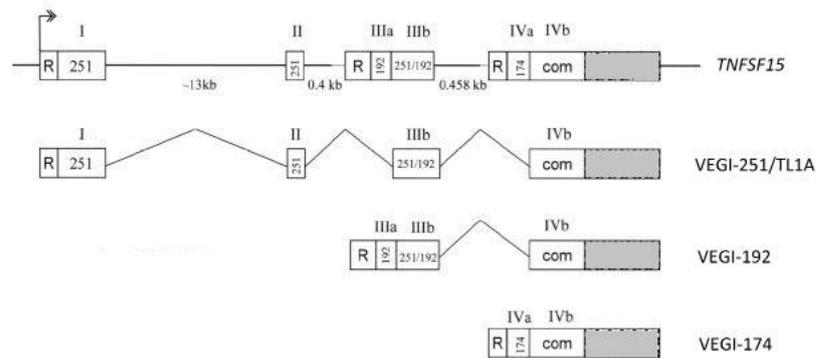


Figura 1. Estructura del gen TNFSF15 y generación de las tres isoformas de VEGI a partir del mismo. Los exones están representados con números romanos (I, II, III y IV) y los intrones por líneas horizontales. Los extremos 5'-UTR de cada isoforma se representan con una R, los extremos 3'-UTR son comunes a las tres isoformas (región gris) y la flecha indica el inicio de transcripción. Adaptado de (Chew et al., 2002).

VEGI-174 fue identificado en 1997 como un factor derivado de células endoteliales que inhibía el crecimiento de las mismas *in vitro* y el desarrollo de tumores *in vivo*. La expresión del ARNm correspondiente a este factor se encontró restringida a células endoteliales arteriales primarias y monocitos, y no se vio expresión del mismo en células B o T (Tan et al., 1997), aunque actualmente se piensa que esta isoforma puede ser un “artefacto de clonado” (Migone et al., 2002).

VEGI-192 fue descrito en 2002, siendo su principal función reportada la inhibición de la angiogénesis (Chew et al., 2002). En un trabajo realizado utilizando el modelo de carcinoma pulmonar de Lewis en ratones, se observó que el tratamiento sistémico con VEGI-192 inhibía la formación de tumores y producía la disminución del tamaño de tumores ya establecidos debido a su acción anti-angiogénica. El resultado del

tratamiento con VEGI-192 produjo una disminución de células endoteliales de los vasos sanguíneos tumorales de cerca del 90% en comparación con los controles sin tratar. Además, el tratamiento con VEGI-192 no mostró toxicidad sobre el hígado o los riñones en las condiciones experimentales, lo cual indicaría una especificidad de este factor por el endotelio en crecimiento de la vasculatura de tumores y no por el de la vasculatura quiescente de tejidos normales (Hou et al., 2005).

TL1A (VEGI-251/TNFSF15), la proteína en la cual se basó este trabajo, fue identificada por primera vez por Migone y colaboradores en 2002 por su semejanza de secuencias con TNF- α partir de librerías de ADNc de células endoteliales, y por su alta homología con TL1 (VEGI-174), el cual había sido previamente reportado. En dicho trabajo se observó expresión de TL1A en distintas líneas de células endoteliales, y también se identificaron como sus receptores a DR3 (del inglés: *Death Receptor 3*) y DcR3 (del inglés: *Decoy Receptor 3*) (Migone et al., 2002).

TL1A se expresa en diferentes tipos celulares en forma muy regulada tanto *in vitro* como *in vivo*. En forma basal se observó expresión especialmente en líneas de células endoteliales humanas como son HUVEC (células endoteliales de la vena umbilical humana), HMVEC-Ad (células endoteliales microvasculares dérmicas adultas), y UtMEC-Myo (células endoteliales del miometrio uterino). Además, la expresión de TL1A por parte de estas células se induce en presencia de citoquinas proinflamatorias, como TNF- α e IL-1 β (Migone et al., 2002). Esta

inducción no es duradera en el tiempo: los niveles de TL1A vuelven a la línea de base rápidamente (aproximadamente 24 horas luego de la inducción). Esto podría deberse a la presencia de elementos ricos en AU en la región 3' no codificante del ARNm, que contribuyen a la inestabilidad del mismo (Meylan et al., 2008).

Varios tipos celulares del sistema inmune también expresan TL1A bajo diferentes estímulos. En células del sistema inmune innato como monocitos, macrófagos y células dendríticas, se expresa tras señalización mediante receptores tipo Toll (TLRs) y receptores de Fcγ (es decir, estimulación a través de inmunocomplejos). Dentro del sistema inmune adaptativo, los linfocitos T expresan TL1A bajo condiciones inflamatorias o como respuesta a estímulos recibidos a través del TCR (Bayry, 2010). La expresión de TL1A en los linfocitos T que han sido activados a través de su TCR se da en forma más lenta pero más sostenida en el tiempo en comparación con las células endoteliales activadas por citoquinas proinflamatorias y las células del sistema inmune innato, manteniéndose los niveles de ARNm de TL1A elevados durante al menos 48 horas luego de la activación (Meylan et al., 2008).

Como otros miembros de la familia, TL1A puede presentarse como proteína de membrana o en forma soluble. En una primera etapa es expresado anclado a la membrana y luego su ectodominio puede encontrarse en el espacio extracelular o en suero tras la acción

proteolítica de una metaloproteasa celular (Hedl and Abraham, 2014; Kim and Zhang, 2005).

En referencia a su estructura, TL1A, junto con 8 miembros más de la TNFSF (TNF- α , FasL, LIGHT, LT α , LT β , TRAIL, RANKL y CD40L), pertenece a la familia convencional de TNF, la cual incluye proteínas transmembrana de tipo II que forman homotrímeros. En forma soluble TL1A se encuentra en forma estable como un homotrímero, donde cada subunidad del mismo tiene una estructura de barril β tipo remolino, uniéndose entre sí de forma no covalente. El trímero de TL1A presenta un peso molecular de aproximadamente 63 kDa según su coeficiente de sedimentación y de 66 kDa según cromatografía de exclusión molecular. A partir de la estructura cristalográfica de TL1A a una resolución de 2,5 Å se observa que los miembros de la familia con los que presenta mayor similitud estructural son CD40L y TRAIL (Zhan et al., 2009). Es en esta conformación de trímero que se puede encontrarlo en suero humano en determinadas circunstancias.

1.3 Receptores para TL1A: DR3 y DcR3

DR3 (TNFRSF25) es un miembro de la superfamilia de TNFR descrito simultáneamente por varios grupos entre 1996 y 1997, asignándosele distintos nombres (Apo3, LARD, TR3, TRAMP y WSL-1) (Bodmer et al., 1997; Chinnaiyan et al., 1996; Kitson et al., 1996; Marsters et al., 1996;

Screaton et al., 1997). Consta de 417 aas y tiene un peso molecular de 45 kDa (Chinnaiyan et al., 1996). Es uno de los seis miembros de la TNFRSF que presentan un DD en su región citoplasmática (Aggarwal et al., 2012). Este DD presenta la típica estructura globular, de unos 60 aas, compuesta por 6 hélices α conservadas (Aiba and Nakamura, 2013). En los genomas humano y murino es el miembro con mayor homología de secuencias con el TNFR-I, especialmente en la región citoplasmática donde presentan un 47% de homología (Meylan et al., 2011). Presenta, al igual que el TNFR-I, cuatro dominios repetidos de cisteínas (CRD) en su región extracelular a partir de los cuales se une a su ligando, aparentemente a través del segundo y tercer CRD (Borysenko et al., 2005).

El DD señala a través de la proteína adaptadora TRADD, la cual contiene en su Nt una región de unión a proteínas TRAFs y es capaz de reclutar un complejo compuesto por TRAF2 y RIP, el cual puede activar las vías de MAPK y NF- κ B, conduciendo a la activación de una respuesta pro-inflamatoria y a la síntesis de factores anti-apoptóticos como c-IAP (fig. 2). Alternativamente puede inducir la apoptosis por activación de caspasas debido al reclutamiento de FADD, aunque esto se ha observado *in vitro* cuando se inhibe la producción de c-IAP utilizando ARN interferente en una línea celular de eritroblastos (TF-1) (Wen et al., 2003). Por lo tanto, los efectos de la vía TL1A-DR3 parecerían ser dependientes de la adecuada co-producción de factores anti-apoptóticos (Siakavellas et al., 2015).

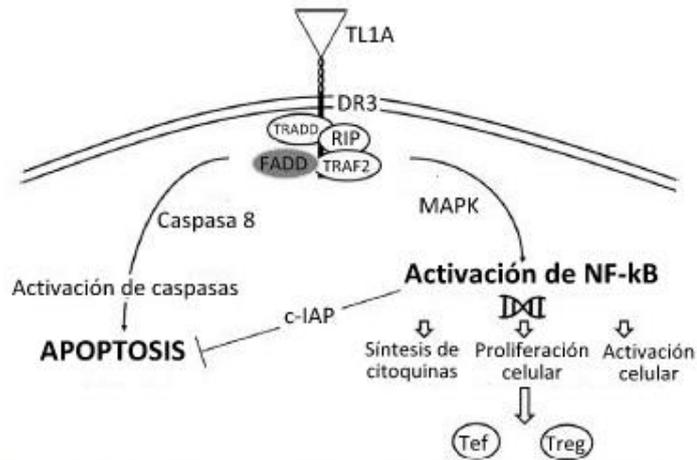


Figura 2. Vías de señalización de TL1A-DR3. La unión de TL1A a DR3 induce la asociación de TRADD al dominio citoplasmático de DR3. Posteriormente pueden ocurrir dos posibilidades: el reclutamiento de FADD, activando la vía de las caspasas efectoras lo cual induce la apoptosis de la célula, o el reclutamiento del complejo TRAF2-RIP, el cual puede activar al NF-κB por medio de MAPK, induciendo una respuesta pro-inflamatoria (producción de citoquinas, proliferación y activación celular), tanto en células T efectoras como en células Tregs. Además la activación de NF-κB induce la producción de c-IAP inhibiendo la apoptosis. Adaptado de (Siakavellas et al., 2015).

A diferencia del TNFR-I, el cual se expresa extensamente en distintos tipos celulares, la expresión de DR3 se ha descrito principalmente en linfocitos (células NK, células NKT y células T), especialmente luego de la activación de los mismos. Además, en estos se da la expresión de distintas isoformas del receptor debido al empalme alternativo del correspondiente ARNm. Se han identificado 13 variantes de empalme en humanos y 3 en ratón (Aiba and Nakamura, 2013), incluyéndose variantes carentes de región transmembrana, lo cual podría indicar que el receptor es secretado en forma soluble (Screaton et al., 1997). DR3 está expresado en mayores niveles en células Th17 que en células Th1 y Th2,

y también se encuentra expresado en células Tregs naturales (nTregs) e inducidas por TGF- β (iTregs) (Aiba and Nakamura, 2013).

La activación de los linfocitos T lleva a un cambio en el perfil de expresión de las isoformas de DR3, aumentando la expresión de la isoforma no truncada del receptor en comparación con las células T vírgenes (Screaton et al., 1997). El aumento en la expresión de DR3 luego de la activación de los linfocitos T por reconocimiento de su antígeno posiblemente se da en paralelo con el aumento de otros receptores de la familia de TNFR (CD27, OX40 y 4-1BB), ocurriendo en las 24 horas siguientes a la activación en el caso de células T naïve y en menor tiempo en células T de memoria (Croft, 2009).

En células B en reposo no se observa expresión de DR3, pero ésta se induce por activación a través del BCR (Cavallini et al., 2013).

En cuanto al segundo receptor para TL1A, el DcR3 (TNFRSF6b), se encuentra en forma soluble y es capaz de reconocer tres ligandos distintos: TL1A, FasL (TNFSF6) y LIGHT (TNFSF14). DcR3 es una proteína de 300 aas glicosilada con un peso de 33 kDa, que codifica en el cromosoma 20 en humanos (locus 20q13.3). Interesantemente no se encuentra en los genomas de ratón o rata, pero sí en los genomas de algunos anfibios, aves y otros mamíferos. Funciona como un agente neutralizante de los ligandos a los cuales se une y además cumple otras funciones de modulación sobre distintos tipos celulares. DcR3 tiene

diferentes efectos al actuar sobre distintos ligandos, por lo tanto se lo puede definir como un inmunomodulador (Lin and Hsieh, 2011).

DcR3 se ha visto sobreexpresado en distintas enfermedades de índole autoinmune (artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, lupus sistémico eritematoso, etc.), infecciones bacterianas, síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) y cáncer, y por lo tanto se ha propuesto como un biomarcador para las mismas. Numerosos trabajos en los últimos años relacionan los altos niveles de DcR3 en suero o tejidos con varios tipos de cáncer (Lin and Hsieh, 2011), y además se ha encontrado evidencia de que cierto polimorfismo de un promotor de DcR3 se asocia con riesgo elevado de sufrir carcinoma de células escamosas de esófago en una población china, posiblemente por inducción de la expresión de DcR3 (Xiong et al., 2010). Por otro lado, en pacientes con artritis reumatoide los niveles de DcR3 se encuentran elevados tanto en suero como en fluidos sinoviales en comparación con individuos controles (Xiu et al., 2015).

1.4 Vía de señalización TL1A-DR3

Como se mencionó anteriormente, DR3 se expresa en linfocitos, principalmente células NK, NKT y células T. Tiene la peculiaridad de presentar un dominio de muerte celular pero ser capaz de generar activación de células T de forma similar a otros receptores de la familia de TNFR. Sin embargo, actúa en forma más tardía en la activación y

expansión de los linfocitos T que los demás receptores de la TNFRSF (Meylan et al., 2011). Por su parte la expresión de TL1A está regulada de forma muy estricta, siendo prácticamente indetectable en tejidos normales. En condiciones de inflamación, por ejemplo por presencia de citoquinas proinflamatorias como TNF e IL-1 β , la expresión de TL1A se induce rápidamente en células endoteliales, y también en macrófagos y células dendríticas por señalización vía TLRs y reconocimiento de inmunocomplejos (Meylan et al., 2011).

La señalización vía TL1A-DR3 parecería estar involucrada en el mantenimiento de la homeostasis de los linfocitos, ya que desregulaciones en la misma se han relacionado con el desarrollo de enfermedades autoinmunes e inflamatorias dependientes de células T (Meylan et al., 2008). La señalización vía DR3-TL1A puede dar lugar a dos destinos celulares muy distintos entre sí: a la apoptosis dependiente de FADD y caspasa 8 o a la activación de las vías de NF- κ B y MAPK (Aiba and Nakamura, 2013). Dentro de estas últimas, la vía de NF- κ B sería la que tiene un rol predominante en la determinación del destino celular, ya que se ha descrito resistencia a la apoptosis por inducción de la expresión de la proteína c-IAP2 en una línea celular de eritroblastos (TF-1) (Wen et al., 2003).

La señalización vía DR3-TL1A tiene diferentes efectos sobre las células del sistema inmune:

1.4.1 Células T CD4⁺: En un principio la evidencia obtenida parecía indicar que los niveles de DR3 eran mayores en células Tregs CD4⁺FoxP3⁺ que en células T convencionales CD4⁺FoxP3⁻. Además se observó que la administración de un anticuerpo monoclonal anti-DR3 en ratones inducía la expansión rápida y selectiva de las Tregs y no de las células T convencionales (Schreiber et al., 2010). Sin embargo, en un trabajo posterior se observó que los niveles de expresión de DR3 en células T CD4⁺ y Tregs son similares y que ambos tipos celulares unen la misma cantidad de TL1A soluble (sTL1A). Las diferencias entre los resultados de ambos trabajos podrían deberse, según comentan los autores, a los anticuerpos anti-DR3 utilizados. Ambos tipos celulares expresan diferentes variantes de DR3: las células Tregs expresan mayormente una variante truncada del receptor, que no contiene el cuarto CRD. Por lo tanto, es posible que un anticuerpo se una en forma diferencial a los dos tipos de células T si reconoce un epítipo que no está presente en la variante más corta (Taraban et al., 2011a).

La interacción DR3-TL1A no es necesaria para la polarización de células T CD4⁺ naïve a los subtipos Th1, Th2 y Th17 *in vitro*. La interacción entre DR3-TL1A, que ocurre durante la presentación de antígeno a la célula T por parte de la célula dendrítica, tiene como efecto coestimular la proliferación de células T y la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-2, IL-4, IFN- γ). La inducción de la proliferación *in vitro* se observa cuando se incuban células T con concentraciones de TL1A mayores a 10

ng/mL, y es dependiente de la presencia de IL-2 y de la ausencia de coestimulación por CD28 (Meylan et al., 2008). Los efectos de TL1A son más notorios en células T activadas o de memoria en comparación con las células T naïve, lo cual puede deberse a que las últimas expresan bajos niveles de la variante no truncada de DR3 (Aiba and Nakamura, 2013). Sin embargo se ha visto que la señalización vía DR3-TL1A en células T naïve puede inducir la producción de citoquinas *in vitro* (IL-2 e IFN- γ) (Meylan et al., 2008).

En células T, la expresión de TL1A endógeno se induce por la activación a través del TCR y es dependiente de la expresión de DR3. Sin embargo, este TL1A actúa de forma autócrina para sostener su propia producción, sin tener efecto sobre la proliferación de las células T o la producción de citoquinas (Meylan et al., 2008).

❖ **Th1:** La diferenciación de células T CD4⁺ naïve a Th1 es independiente de TL1A, según se ha observado utilizando células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCs) de ratones *knock-out* (KO) para TL1A (Pappu et al., 2008). La diferenciación de células T CD4⁺ naïve a células Th1 productoras de IFN- γ se da en presencia de IL-12/IL-18 secretadas por las APCs. La IL-12 induce la expresión de T-bet, un factor de transcripción que estabiliza el fenotipo Th1. TL1A puede actuar sobre células T CD4⁺ de memoria en presencia de IL-12/IL-18 independientemente de estimulación a través del TCR, aumentando los

niveles de secreción de IFN- γ de forma dosis-dependiente. Además, en presencia de estímulo vía el TCR, la presencia de TL1A e IL-12 genera aumento de la secreción de IFN- γ independientemente de IL-18 (Bamias et al., 2006). El aumento de secreción de IFN- γ en presencia de IL-12/IL-18 y TL1A también se ha observado en células T CD8⁺, y en menor grado en células T CD56⁺ y células NK. En diversos modelos de enfermedades inflamatorias crónicas se han encontrado respuestas Th1 exacerbadas y altos niveles de IFN- γ así como niveles elevados de TL1A y DR3, lo cual podría indicar que éstos están implicados en la patogénesis de distintas enfermedades (Papadakis et al., 2004).

❖ **Th2:** Las células NKT están implicadas en la polarización de células T CD4⁺ a un fenotipo Th2, y expresan basalmente altos niveles de DR3, el cual coestimula la producción de IL-13 por estas células. La señalización vía DR3-TL1A en las Th2 induce la producción de citoquinas Th2 amplificando las respuestas inmunes. Los efectos de la señalización a través de DR3 en células NKT y Th2 fueron identificados como los principales responsables de la inflamación alérgica pulmonar, la cual se relaciona directamente con el asma (Fang et al., 2008).

❖ **Th17:** La IL-2 inhibe la diferenciación de células T CD4⁺ naïve al fenotipo Th17 de forma dependiente de STAT5. Por lo tanto, si la IL-2 es bloqueada es posible inducir la diferenciación de células T CD4⁺

naïve estimuladas a través del TCR a un fenotipo Th17, bajo las condiciones adecuadas (presencia de TGF- β e IL-6, y también IL-23 e IL-21) (Laurence et al., 2007; Pappu et al., 2008). TGF- β e IL-6 promueven la expresión de DR3 en células T CD4⁺ de ratón, especialmente de la variante no truncada (o *full-length*) (Pappu et al., 2008). Por lo tanto DR3 está especialmente elevado en células Th17, y la señalización vía ese receptor es importante en la inducción de la proliferación de estas células en condiciones de estimulación subóptima del TCR, pero no influye de manera significativa en la producción de IL-17 (Jones et al., 2011; Pappu et al., 2008).

Existe controversia respecto al rol polarizante de TL1A de células T naïve a células Th17. TL1A podría influir en la polarización de células T CD4⁺ naïve al fenotipo Th17, ya que se ha observado una pequeña disminución de la diferenciación a este fenotipo utilizando BMDCs KO para TL1A en comparación a los resultados empleando BMDCs salvajes (WT). Esto ocurre únicamente cuando la IL-2, cuya producción es inducida por TL1A en células T CD4⁺ activadas vía el TCR, es bloqueada (Pappu et al., 2008). Además, estudios *in vitro* a partir de células T CD4⁺ naïve de pacientes con artritis reumatoide parecerían indicar que TL1A actúa en forma sinérgica con IL-6 y TGF- β promoviendo la diferenciación a un fenotipo Th17, con el consecuente aumento en los niveles de IL-17 (Zhou et al., 2014). Sin embargo, en otro trabajo realizado *in vitro* con esplenocitos en condiciones polarizantes para Th17, TL1A bloqueó la

diferenciación a este fenotipo en forma dosis-dependiente incluso en ausencia de IL-2. Esta inhibición de la polarización a Th17 por parte de TL1A sería independiente de STAT1. Sin embargo, en células Th17 ya diferenciadas, TL1A actuaría induciendo su proliferación y manteniendo sus características fenotípicas (Jones et al., 2011). En conclusión, se observa una diferencia entre las acciones de TL1A en las distintas subpoblaciones de células T (naïve y activadas/de memoria).

Se ha propuesto que TL1A actuaría en forma sinérgica con IL-23 promoviendo la proliferación y las acciones efectoras de las células Th17 activadas/de memoria (Pappu et al., 2008). Este rol podría explicar los efectos patogénicos que tiene la señalización vía TL1A-DR3 en distintas enfermedades inflamatorias dependientes de células T. En la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), un modelo experimental de enfermedad autoinmune dependiente de Th1 y Th17, se ha visto una marcada disminución de la severidad clínica de la enfermedad en ratones KO para TL1A (Pappu et al., 2008) o KO para DR3 (Meylan et al., 2008).

❖ **Tregs:** La estimulación mediante TGF- β de células T CD4⁺ naïve activadas vía el TCR también puede inducir la expresión de FoxP3, lo que lleva a la generación de células T reguladoras inducidas (iTregs). Al igual que en las células Th17, TGF- β induce la expresión de DR3 en células Tregs tanto naturales como inducidas. Sin embargo en estas células una alta proporción del receptor se corresponde con la variante

transmembrana truncada (carente del cuarto CRD) (Pappu et al., 2008). TL1A promueve la activación y proliferación de células Tregs coestimuladas vía CD3. Sin embargo, en estas condiciones la capacidad de las Tregs de controlar la expansión de las células T convencionales se ve opacada probablemente porque TL1A también estimula la proliferación de las células T efectoras en mayor proporción (Taraban et al., 2011b).

1.4.2 Células T CD8⁺: La acción de TL1A sobre las células T CD8⁺ no está descrita extensamente. En ratones KO para DR3 se ha observado una respuesta de células T CD8⁺ primaria y secundaria normal para infecciones sistémicas con el virus Influenza, así como respuestas normales en infecciones con *Toxoplasma* (Meylan et al., 2011). Sin embargo, el bloqueo de la señalización vía TL1A-DR3 en ratones expuestos a infecciones con Citomegalovirus murino o Vaccinia virus compromete la respuesta inmune adaptativa dependiente de células T CD8⁺ y CD4⁺ al disminuir su proliferación, permitiendo una mayor replicación viral y por lo tanto una infección aguda más pronunciada (Twohig et al., 2012).

Además, existe evidencia de que la vía TL1A-DR3 podría tener un rol anti-tumoral *in vivo* a través de la activación de células T CD8⁺ naïve, promoviendo su expansión y diferenciación a linfocitos T citotóxicos, y también induciendo la proliferación de células T CD8⁺ de memoria en

respuestas secundarias tras el reencuentro con células tumorales (Slebioda et al., 2011).

1.4.3 Células B: Los efectos de la vía de señalización de DR3-TL1A han sido muy estudiados en células T especialmente CD4⁺, sin embargo la información que se tiene con respecto a las células B es escasa. Las células B en reposo expresan DR3 a niveles casi indetectables, pero la activación a través del BCR induce la expresión de este receptor. En células B activadas mediante dosis subóptimas de anticuerpos anti-IgM y presencia de IL-2, TL1A inhibe la proliferación tanto en células B naïve como de memoria. Esta inhibición no provoca cambios fenotípicos en las células B ni desencadena su apoptosis, sino que actuaría sobre la frecuencia de división celular. Sin embargo, utilizando dosis saturantes de anti-IgM o combinaciones de anti-IgM con otros estimuladores de células B (CD40L o CpG oligodesoxinucleótido), TL1A no tiene ningún efecto sobre la proliferación de las células B. Estos resultados parecen otorgarle a TL1A un papel en el mantenimiento de la homeostasis de las células B efectoras en las respuestas inmunes (Cavallini et al., 2013).

Los efectos de TL1A que se observan en los distintos experimentos *in vitro* dependen de las condiciones experimentales, por lo tanto se puede suponer que la acción de TL1A en el individuo es dependiente del contexto de cada respuesta inmune particular (Pappu et al., 2008).

1.4.4 Células NK y NKT: TL1A puede actuar en forma sinérgica con IL-12/IL-18 en el aumento de la producción de IFN- γ en células NK y NKT, de forma similar a lo observado para las células T CD4⁺. En células NKT y sobre todo en células NK la expresión de DR3 aumenta significativamente en presencia de IL-12/IL-18, a diferencia de lo que ocurre en células T CD4⁺ que requieren de la estimulación vía el TCR. Sin embargo, el aumento de la producción de IFN- γ en presencia de TL1A e IL-12/IL-18 es mayor en células T en comparación con las células NK. El efecto de TL1A sobre las poblaciones celulares mencionadas anteriormente es diferente: en células T y células NKT aumenta tanto el número de células productoras de IFN- γ como la cantidad de IFN- γ producido por célula, mientras que en células NK sólo incrementa el número de células productoras. La sensibilidad a la estimulación por TL1A en la producción de IFN- γ es mayor en células T CD4⁺, lo cual indica la importancia de la vía DR3-TL1A en las respuestas Th1. Las células NK son las que presentan menor sensibilidad a TL1A, sin embargo la alta inducción de la expresión de DR3 parece indicar que la vía DR3-TL1A puede tener otros efectos en estas células además de la producción de INF- γ (Papadakis et al., 2004). De hecho, se ha visto que TL1A aumenta la actividad citotóxica de las células NK activadas en presencia de IL-12/IL-18 sobre algunas líneas celulares tumorales resistentes a NK, mediante mecanismos independientes de la producción de IFN- γ (Heidemann et al., 2010). Por lo

tanto TL1A podría estar implicado en la eliminación de células malignizadas mediante la potenciación de la actividad de las células NK.

1.5 Vía TL1A-DR3 en autoinmunidad e inflamación

Numerosos trabajos científicos han reportado un vínculo entre el aumento de la señalización por la vía TL1A-DR3 y la patogénesis de distintas enfermedades inflamatorias y autoinmunes dependientes de la actividad de células T, especialmente de los fenotipos Th1 y Th17 (Pappu et al., 2008; Takedatsu et al., 2008). La desregulación de la vía TL1A-DR3 se ha relacionado con diversas enfermedades reumáticas (artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, esclerosis sistémica y lupus eritematoso sistémico) (Siakavellas et al., 2015), enfermedades inflamatorias de la piel como la psoriasis (Bamias et al., 2011) y enfermedades inflamatorias intestinales (IBD) como la enfermedad de Crohn (Slebioda and Kmiec, 2014). También se ha visto implicada en modelos murinos de EAE (Meylan et al., 2008; Pappu et al., 2008), colitis (Bamias et al., 2010), uveítis (Qin, 2011) e inflamación alérgica pulmonar (Fang et al., 2008).

En muchas de estas enfermedades se han reportado niveles séricos elevados de TL1A y/o DcR3. En el lupus eritematoso sistémico (LES), los niveles elevados de DcR3 parecerían correlacionarse con la actividad de la enfermedad (Lee et al., 2008). Además, ratones transgénicos que sobreexpresan DcR3 desarrollan una patología tipo LES, por lo tanto este

receptor podría estar involucrado en la patogénesis de LES en humanos (Han et al., 2007). Por otro lado, se ha reportado que pacientes con psoriasis presentan niveles elevados de TL1A y DR3 en lesiones de la piel, además de elevados niveles de TL1A séricos que se relacionan con el aumento de la producción de IL-17 (Bamias et al., 2011; Li et al., 2014a). En el caso de la espondilitis anquilosante (EA), los niveles elevados de TL1A en suero disminuyen en remisiones espontáneas o tras tratamientos exitosos con agentes biológicos como anti-TNF- α (Konsta et al., 2013), lo cual convierte a TL1A en un marcador atractivo de actividad de esta enfermedad.

A pesar de que algunos investigadores han reportado valores de TL1A en suero en pacientes con algunas de estas enfermedades, por ejemplo en colitis ulcerosa (CU) y EA (Tabla I), los roles que cumple la vía TL1A-DR3 han sido descritos más extensamente en la artritis reumatoide y en la enfermedad de Crohn, por lo cual se describirán las mismas en mayor detalle a continuación.

Tabla I. Niveles séricos de TL1A en pacientes con colitis ulcerosa (CU) y espondilitis anquilosante (EA). Los mismos fueron determinados mediante ELISA utilizando anticuerpos anti-TL1A comerciales (Peprotech). Datos extraídos de (Bamias et al., 2010) y (Konsta et al., 2013).

COLITIS ULCEROSA	Mediana (pg/mL)	Rango (pg/mL)
Controles sanos	187,4	0 - 2166,5
CU activa	432,4	174 - 7691,5
CU en remisión	389,3	0 - 6654,8
ESPONDILITIS ANQUILOSANTE	Media ± error estándar (pg/mL)	
Controles sanos	226,7 ± 48,24	
EA sin tratamiento anti-TNF	581 ± 157	
EA con tratamiento anti-TNF	178 ± 42,0	

1.5.1 Artritis reumatoide: La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune crónica que afecta a aproximadamente un 1% de la población mundial, especialmente a mujeres. Se caracteriza por inflamación persistente e hiperplasia de las articulaciones sinoviales, pudiendo desencadenarse la destrucción local de cartílago y hueso. La inflamación de las articulaciones se manifiesta por infiltración de células activadas desde la sangre (células T, macrófagos, plasmocitos), y por altos niveles de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6) y enzimas, principalmente metaloproteinasas de matriz (MMPs). Además pueden presentarse otras manifestaciones sistémicas de inflamación, por ejemplo inducción de proteínas de fase aguda (Feldmann et al., 1996a).

Una gran proporción de los pacientes con AR presentan anticuerpos autorreactivos que en conjunto se denominan factor reumatoideo (RF), los

cuales son principalmente del isotipo IgM, aunque también pueden ser de los isotipos IgA e IgG. El nivel de RF sérico es utilizado para el diagnóstico y el seguimiento de esta enfermedad. Estos auto-anticuerpos suelen reconocer las regiones Fc de las IgG modificadas carentes de galactosa, las cuales están elevadas en estos pacientes (Westwood et al., 2006). También existen auto-anticuerpos que reconocen epítopes independientes de oligosacáridos como la filagrina. Los complejos que se forman podrían contribuir a la patogénesis de la AR activando el sistema complemento y la síntesis de citoquinas proinflamatorias (Feldmann et al., 1996a). Los auto-anticuerpos son generados por linfocitos B que escapan los mecanismos de tolerancia de los centros germinales, y alcanzan estructuras similares a centros germinales que se generan en el sinovio y que permiten, además de la activación de estos linfocitos B, el cambio de clase y la hipermutación somática de forma análoga a lo que ocurre normalmente, con pérdida de auto-tolerancia (William et al., 2002).

Sin embargo, no todos los pacientes con AR presentan auto-anticuerpos, por lo tanto se diferencian dos grupos dentro de esta enfermedad: pacientes RF-positivos y RF-negativos. Además, se ha descrito la presencia de RF en otras enfermedades, por lo tanto no serían un indicador específico de AR (Feldmann et al., 1996a).

Por otro lado, se ha descrito la presencia de anticuerpos contra proteínas citrulinadas cíclicas (CCPs) en pacientes con AR. Los anticuerpos anti-CCP reconocen a la citrulina, la cual surge de una modificación de la

arginina catalizada por una deiminasa aparentemente regulada de forma hormonal (van Venrooij and Pruijn, 2000). Si bien las CCP son más prevalentes a nivel sinovial en pacientes con AR, en los cuales se encuentran en más del 50%, los individuos sanos también pueden presentar estas proteínas modificadas en menor proporción (cerca de un 5%) (De Rycke et al., 2005). Sin embargo, la aparición de anticuerpos anti-CCP no ocurre en individuos sanos, lo cual refleja la existencia de una respuesta inmune anormal en pacientes con AR. Los anticuerpos anti-CCP se han descrito además en otras enfermedades reumáticas como LES (Popescu et al., 2013), sin embargo en la AR se han identificado en mayores niveles e incluso años antes de que aparezcan los síntomas clínicos de la enfermedad (Vossenaar and van Venrooij, 2004).

Además del RF y anticuerpos anti-CCP, la patogénesis de la AR es dependiente de citoquinas proinflamatorias y miembros de la TNFRSF y sus ligandos. Se han reportado niveles elevados de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1, IL-6 y GM-CSF, y de quimioquinas como IL-8. También se han observado niveles elevados de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- β , y de inhibidores de citoquinas como TNFR-I soluble, sin embargo éstos no son suficientes para contrarrestar los efectos de las citoquinas proinflamatorias (Feldmann et al., 1996b). La acción de TNF- α parecería ser central en la patogénesis de la AR según ha sido reportado en distintos trabajos tanto *in vitro* como *in*

vivo. Por un lado, cultivos celulares derivados de tejidos sinoviales de pacientes con AR tratados con anticuerpos anti-TNF- α disminuyeron significativamente la producción de IL-1 β (Brennan et al., 1989). Por otro lado, líneas de ratones transgénicos expresando un transgen de TNF- α humano con la región 3' rica en AU modificada para aumentar la estabilidad del ARNm resultaron en el desarrollo de poliartritis inflamatoria crónica debido a la sobreexpresión de TNF- α . Además, el tratamiento de estos ratones con un anticuerpo monoclonal neutralizante anti-TNF- α humano evitó el desarrollo de la enfermedad (Keffer et al., 1991).

En humanos, las primeras pruebas clínicas con agentes anti-TNF- α se realizaron con un anticuerpo monoclonal neutralizante quimérico anti-TNF- α del subtipo IgG1 con el cual se observó una mejoría en los parámetros clínicos y de laboratorio correspondientes a la AR (Elliott et al., 1993). En recaídas, el tratamiento con este anticuerpo continuó siendo efectivo, lo cual demuestra el rol preponderante de TNF- α en la patogénesis de la enfermedad (Elliott et al., 1994). Posteriormente surgieron otros agentes terapéuticos neutralizantes de TNF- α que también fueron efectivos (Rankin et al., 1995).

Además del TNF- α , otro miembro de la TNFSF que ha sido vinculado extensamente a la patogénesis de la AR es TL1A.

Utilizando un modelo de ratón de artritis inducida por antígeno (AIA), que presenta una patología muy similar a la AR, se observó que ratones KO

para DR3 presentan sintomatología significativamente más leve de la enfermedad en comparación con los ratones WT. Resultados similares se obtienen administrando anticuerpos anti-TL1A a los ratones WT, lo cual también confiere protección contra la patología de la AIA (Bull et al., 2008). Por otro lado, se ha visto que la señalización vía TL1A-DR3 en presencia de IFN- γ induce la producción de MMP-9 e IL-8 en una línea celular de macrófagos (THP-1) (Kang et al., 2005). Las MMPs están involucradas en la depleción de cartílago en la AR. Consistentemente, los ratones KO para DR3 mostraron una reducción en la depleción de cartílago en el modelo de AIA en comparación con los ratones WT (Bull et al., 2008). Además, estudios *in vitro* parecerían indicar que la señalización vía TL1A-DR3 promueve la diferenciación de macrófagos a osteoclastos e inhibe la diferenciación a osteoblastos, lo que generaría un desbalance en la remodelación normal del hueso que podría relacionarse con la destrucción del mismo observada en pacientes con AR (Bull et al., 2008).

En humanos se ha visto que el TL1A, en conjunto con la estimulación a través del TCR, induce la producción de TNF- α por parte de las células T que infiltran el sinovio. En condiciones de polarización a un fenotipo Th17, TL1A también lleva a un aumento en la secreción de IL-17 al inducir la proliferación de estas células T. El aumento de TNF- α e IL-17 en respuesta a TL1A podría generar un círculo que agravaría la patogénesis de la AR (Zhang et al., 2009).

Por otro lado, TL1A aumenta el tamaño y número de centros germinales en el bazo, por lo que se lo ha asociado a la activación y proliferación de células B. En relación a esto, se ha propuesto que un individuo genéticamente predispuesto, bajo estimulación por antígenos ambientales, podría aumentar de forma excesiva los niveles de TL1A en órganos linfoides secundarios, lo cual podría inicial la patogénesis de la AR por ejemplo por producción de auto-anticuerpos (Zhang et al., 2009).

Además de la presencia de auto-anticuerpos, la AR también se caracteriza por elevados niveles de inmunocomplejos. En pacientes RF-positivos, los monocitos sinoviales estimulados por inmunocomplejos insolubles aumentan notoriamente la producción de TL1A soluble, el cual puede acumularse localmente en los tejidos sinoviales o ser liberado a la sangre. Otras células (neutrófilos y linfocitos de sangre periférica) son incapaces de expresar grandes cantidades de TL1A en presencia de inmunocomplejos, LPS u otros estímulos proinflamatorios, por lo tanto se propone que los monocitos serían una de las principales fuentes de TL1A en esta enfermedad. La liberación de TL1A se da de forma más lenta en comparación con otras citoquinas proinflamatorias como TNF- α , pero se mantiene durante más tiempo (Cassatella et al., 2007).

La producción de TL1A en pacientes con AR está inducida tanto a nivel sinovial como a nivel sistémico, si bien el nivel de TL1A en el fluido sinovial es mayor que en el suero de cada paciente en particular (Sun et al., 2013; Xiu et al., 2015). En el fluido sinovial, la expresión de TL1A se

induciría en condrocitos y fibroblastos en presencia de IL-1 β y TNF- α tras unas 20 horas de estimulación, según se ha observado *in vitro*. Además de la producción local de TL1A en las articulaciones, otros tejidos pueden expresar TL1A aumentando sus niveles en suero, por ejemplo células dendríticas y monocitos/macrófagos de nodos linfáticos drenantes de sitios de inflamación (Zhang et al., 2009).

Los pacientes con AR que son RF-positivos y tienen anticuerpos anti-CCP presentan niveles especialmente elevados de TL1A en suero y fluidos sinoviales (Bamias et al., 2008; Sun et al., 2013; Xiu et al., 2015). De hecho, los niveles séricos de TL1A se correlacionan con la actividad de la enfermedad en pacientes RF-positivos, por lo que ha sido propuesto como un marcador de inflamación en la AR (Bamias et al., 2008; Xiu et al., 2015). Específicamente, se ha reportado que los niveles séricos de TL1A en pacientes RF-positivos con la enfermedad activa duplican los de los pacientes en remisión (Tabla II). En pacientes RF-negativos no se observa una diferencia entre ambos grupos de pacientes, si bien los niveles se encuentran elevados en comparación con los controles sanos. Por otro lado, se observó una diferencia entre los niveles séricos de TL1A en las distintas etapas de la enfermedad, aumentando notoriamente en la fase severa/terminal de la misma (Bamias et al., 2008). Además, se observó un descenso de los niveles de TL1A en el suero de 9 de 10 pacientes luego del tratamiento con anti-TNF- α (adalimumab), obteniéndose medias de concentración de TL1A sérico de 6,77 ng/mL

antes y 2,8 ng/mL después de 3 meses de tratamiento (Bamias et al., 2008; Xiu et al., 2015).

Por lo tanto, el nivel de TL1A en suero podría ser útil como un marcador de inflamación en la AR, especialmente en pacientes RF-positivos o en pacientes con la enfermedad avanzada, en los cuales se observa una clara correlación positiva con la actividad de la enfermedad según parámetros clínicos (Bamias et al., 2008).

Tabla II. Niveles séricos de TL1A en pacientes con artritis reumatoide. Los mismos fueron determinados mediante kit de ELISA (Peprotech). Datos extraídos de (Bamias et al., 2008).

	Estado de la enfermedad	Media \pm desviación estándar (ng/mL)
Controles sanos	-	0,89 \pm 0,86
RF-positivos	Activa	8,2 \pm 8,7
	En remisión	4,1 \pm 4,1
RF-negativos	Activa	1,96 \pm 1,58
	En remisión	1,93 \pm 1,08

Por último, los niveles del receptor soluble de TL1A, DcR3, también se encuentran elevados en suero y fluidos sinoviales en pacientes con AR en comparación con individuos sanos. Sin embargo no se observa una correspondencia de estos niveles con el nivel de RF, anticuerpos anti-CCP u otros marcadores de actividad de esta enfermedad (Xiu et al., 2015). Por lo tanto se ha propuesto que el aumento de DcR3, inducido por TNF- α , actúa en respuesta a los niveles elevados de TL1A con una

función anti-inflamatoria (Xiu et al., 2015). Sin embargo, su rol en la patogénesis de la AR no está completamente claro.

Es interesante mencionar que la AR se ha catalogado como un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares, ya que la mortalidad por este motivo en pacientes con AR representa un 30% más que en individuos que no presentan esta enfermedad, y además el riesgo de sufrir infarto de miocardio y accidente cerebrovascular es aproximadamente el doble (Solomon et al., 2006). El desarrollo de enfermedades cardiovasculares en pacientes con AR ha sido relacionado en varios trabajos a la vía de señalización de DR3-TL1A, la cual podría tener un rol proaterogénico. La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica y progresiva de la vasculatura que se caracteriza por la formación de placas fibrosas (placas de ateroma) en las paredes de las arterias principales. Estas placas comienzan a formarse a partir de células espumosas, las cuales se originan de macrófagos y células del músculo liso de la arteria. La formación de las células espumosas se debe a una desregulación de la endocitosis de formas modificadas de las LDL, por ejemplo LDL acetiladas u oxidadas, y el eflujo de colesterol. Se han descrito altos niveles de DR3 y TL1A en regiones ricas en células espumosas de placas de ateroma (Kang et al., 2005), los cuales producirían un aumento de la endocitosis de formas modificadas de LDL y una disminución de la liberación de colesterol según se ha observado *in vitro* en líneas celulares de macrófagos. En las mismas, la vía TL1A-DR3 induce la expresión de

los genes de los tres receptores barrenderos y de LPL, y una disminución de la expresión de los genes de apo-E y ABCG-1 (McLaren et al., 2010). Estudios *in vivo* también han demostrado una correlación de los niveles séricos de TL1A con el progreso de placas de ateroma en la carótida y arterias femorales (Bamias et al., 2013). En dicho trabajo el seguimiento de las placas se realizó por ultrasonido durante aproximadamente 40 meses, observándose que pacientes con bajos niveles de TL1A y de DcR3 mantenían un perfil estabilizado de las placas de ateroma y eran menos propensos a desarrollar nuevas placas.

Resumiendo, la AR es una enfermedad que no posee un indicador definitivo. Para el diagnóstico suelen utilizarse los niveles séricos de RF, sin embargo los inmunoensayos utilizados pueden dar lugar a falsos positivos (Hennig et al., 2000). Más recientemente se han comenzado a medir los niveles de anticuerpos anti-CCP (Westwood et al., 2006), sin embargo su presencia también se relaciona con otros desórdenes autoinmunes como LES, especialmente en pacientes con artritis erosiva (Budhram et al., 2014). Además, los anticuerpos anti-CCP no parecerían ser indicados para el seguimiento de la AR ya que no está comprobado que sus niveles disminuyan tras el tratamiento con anticuerpos anti-TNF- α , como ocurre con los niveles de RF (Westwood et al., 2006). Para el diagnóstico de la AR se utilizan una combinación de factores: RF (subtipos IgM, IgA e IgG), anticuerpos anti-CCP, anticuerpos anti-IL-1 α ,

velocidad de sedimentación eritrocitaria, proteína C reactiva y proteína de matriz oligomérica de cartílago (Lindqvist et al., 2005).

Por otra parte, el diagnóstico temprano de la enfermedad es clave en el éxito de las terapias que se utilizan actualmente. Esto se subraya especialmente en un estudio realizado en una población malayo-polinesia de pacientes con AR positivos para RF, en el cual se demuestra que podría existir una ventana de oportunidad en la cual, si se instaura un tratamiento agresivo, se podría mejorar el pronóstico de los pacientes significativamente (Darmawan et al., 2004). En este trabajo se observó una mejoría en los indicadores de la enfermedad cuando se comenzó el tratamiento antes de pasados 4 meses desde la aparición de los síntomas. El tratamiento, que constó de una combinación de agentes anti-inflamatorios e inmunosupresores administrados vía intravenosa (metilprednisolona, ciclofosfamida y metotrexato) y vía oral (ciclosporina A), no resultó en mejorías en pacientes que habían comenzado a desarrollar la enfermedad más de 4 meses antes del inicio del tratamiento.

Por lo tanto, un diagnóstico temprano es importante para mejorar el pronóstico de los pacientes, lo cual resalta la importancia de encontrar indicadores confiables para esta enfermedad. La detección temprana de niveles elevados de TL1A podría ser de utilidad para este fin.

1.5.2 Enfermedad de Crohn: La enfermedad de Crohn (EC) junto con la CU son las IBD más prevalentes. La EC es un desorden crónico caracterizado por inflamación del tracto gastrointestinal, principalmente en el íleo y el colon, pudiéndose presentar lesiones discontinuas y transmurales (fisuras, abscesos y fístulas). También puede presentarse fibrosis intestinal y úlceras. Los síntomas incluyen dolor abdominal, diarrea, malnutrición y anemia, entre otros (Bossuyt, 2006).

La patogénesis de la EC se ha explicado a través de un modelo que está extensamente aceptado actualmente. En condiciones fisiológicas el intestino delgado y particularmente el intestino grueso coexisten con una enorme cantidad de bacterias localizadas en el lumen de los mismos, en una relación simbiótica muy desarrollada. La proximidad entre las células del sistema inmune presentes en la mucosa intestinal y las bacterias y sus productos implica un equilibrio muy delicado en el cual intervienen citoquinas pro y anti-inflamatorias y miembros de la familia de TNFSF, posibilitando el mantenimiento de una flora comensal normal (Bamias et al., 2012; Slebioda and Kmiec, 2014). La mucosa intestinal puede entrar en contacto con la microbiota o con productos de la misma debido a daños temporales en la barrera epitelial o a defectos en la barrera química (mucus, IgA y defensinas). En este caso el sistema inmune innato monta una respuesta en la cual ocurre la fagocitosis de estos componentes y la liberación de citoquinas proinflamatorias, algunas de las cuales también participan en la reparación del tejido dañado (TNF- α , IL-18 e IL-33). Esto

deriva en un proceso de inflamación aguda auto-limitada que permite la rápida eliminación de las bacterias (fig. 3 A) (Bamias et al., 2012).

Sin embargo, cuando algunos de estos mecanismos no funcionan correctamente, puede generarse un estado de inflamación crónica, característico de la EC y de otras enfermedades inflamatorias intestinales. De hecho, se considera que la inmunopatogénesis de la EC se basa en fallas a distintos niveles de la respuesta inmune innata: en la integridad de la barrera física o química del epitelio intestinal, en el reconocimiento de bacterias por parte de las células del sistema inmune en la lámina propia, en el procesamiento intracelular de las mismas o en la secreción de citoquinas proinflamatorias. La eliminación defectuosa de las bacterias en la mucosa promueve la inducción de la respuesta inmune adaptativa, con la consecuente activación de linfocitos en el sitio de inflamación y un gran aumento de citoquinas proinflamatorias que dañan el epitelio intestinal (fig. 3 B) (Bamias et al., 2012).

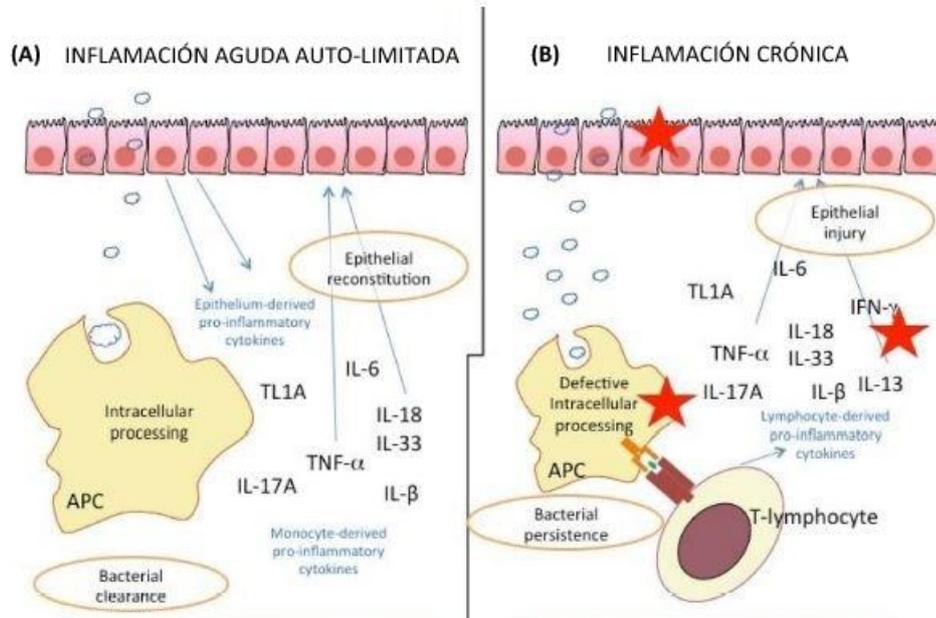


Figura 3. Diagrama del modelo de la respuesta inmune a las bacterias en la mucosa intestinal. (A) Respuesta eficiente del sistema inmune innato a través de mecanismos de fagocitosis y síntesis de citoquinas proinflamatorias, que llevan a una rápida eliminación de elementos bacterianos. **(B)** Respuesta ineficiente del sistema inmune innato que da lugar a la aparición de una respuesta inmune adaptativa, con liberación de un exceso de citoquinas proinflamatorias que generan daño tisular y promueven la inflamación crónica. Adaptado de (Bamias et al., 2012).

La patogénesis de la EC se ha vinculado a factores genéticos y también ambientales. Por un lado, se han identificado mutaciones en distintos genes que se vinculan con el desarrollo de la enfermedad. Estos polimorfismos están relacionados con genes involucrados en la respuesta inmune innata, afectando la permeabilidad del epitelio intestinal en el caso de las mutaciones en los genes de OCTN (Peltekova et al., 2004) y DLG5 (Stoll et al., 2004). También se han relacionado a la señalización inapropiada a través de los TLRs en las células epiteliales de la pared intestinal (Brown et al., 2014) y en los macrófagos de la lámina propia

(Sewell et al., 2012), y a mutaciones en el receptor citoplasmático NOD2 (Bhullar et al., 2014; Long et al., 2014; Salem et al., 2015). Este último juega un papel importante en el reconocimiento intracelular de motivos de muramil-dipéptido de las bacterias, y las mutaciones relacionadas con la EC disminuyen la capacidad antimicrobiana y/o proinflamatoria de las células del sistema inmune innato en respuesta a dicho motivo (Bamias et al., 2012).

Por otro lado, factores ambientales como el tabaquismo y drogas anti-inflamatorias no esteroideas también pueden incrementar la permeabilidad del epitelio a los componentes del espacio luminal (Bjarnason, 1994; Somerville et al., 1984), aumentando la exposición de la lámina propia a la flora comensal.

Existen evidencias experimentales que apoyan este modelo de patogénesis de las IBD. Dos trabajos independientes sobre el modelo de colitis inducida por DSS, demostraron que el bloqueo de TNF- α con un anticuerpo monoclonal resultó en una mejoría de los síntomas en la etapa crónica de la enfermedad, mientras que los agravó al ser administrado en la etapa aguda (Kojouharoff et al., 1997). Además, la inducción de la enfermedad en ratones KO para TNF- α generó síntomas más marcados en comparación con los ratones WT (Naito et al., 2003). Por lo tanto, en la etapa aguda de la enfermedad TNF- α tendría un efecto beneficioso, mientras que en la etapa crónica participaría en la perpetuación de la misma. Por otra parte, se ha descrito que los macrófagos de pacientes

con EC secretan significativamente menores niveles de TNF- α en comparación con individuos sanos tras la estimulación vía diferentes TLRs *in vitro* (Sewell et al., 2012), apoyando la teoría de que respuestas inmunes innatas alteradas están relacionadas con la patogénesis de esta enfermedad.

Resultados similares se han obtenido para TL1A. Se ha reportado que su expresión sostenida se relaciona con el desarrollo de IBD (Shih et al., 2011; Taraban et al., 2011b), sin embargo en inflamaciones agudas y etapas de recuperación la vía TL1A-DR3 sería necesaria para la rápida eliminación de bacterias y el mantenimiento de la homeostasis (Bamias et al., 2012), ya que promovería la maduración de células dendríticas y la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de los macrófagos (Kang et al., 2005). El bloqueo de TL1A o DR3 *in vitro* produce una dramática disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias en células mieloides intestinales y macrófagos, aún a altas concentraciones de ligandos de PRRs o de componentes micobacterianos (Hedl and Abraham, 2014).

Los macrófagos en particular expresan tanto DR3 como TL1A en sus membranas, y esta vía actúa en forma sinérgica con la de NOD2 en la inducción de la producción de citoquinas por la activación de NF- κ B, MAPK y PI3K. Sin embargo, la forma transmembrana de TL1A no es suficiente para la señalización vía DR3. Luego de la estimulación vía NOD2, aumenta la expresión de TL1A y se activa la metaloproteinasa

microsomal TACE, aumentando la concentración de TL1A soluble capaz de señalizar vía DR3 (Hedl and Abraham, 2014). La TACE fue identificada debido a su acción sobre TNF- α , al cual cliva permitiendo la liberación de su ectodominio (Black et al., 1997). De forma análoga actúa sobre TL1A tras la estimulación por la vía NOD2 y la activación de las vías de NF- κ B y MAPK, las cuales están inducidas por TL1A. Por lo tanto, el TL1A autócrino regula su propio clivaje estimulando la actividad de la TACE en conjunto con NOD2 (Hedl and Abraham, 2014).

A pesar de los efectos beneficiosos que TL1A parecería tener en inflamaciones agudas de la mucosa intestinal, sus niveles en suero y en tejidos intestinales se encuentran elevados cuando la inflamación es crónica (Bamias et al., 2010), razón por la cual se lo ha vinculado a la patogénesis de las IBD.

Numerosos trabajos han demostrado que TL1A juega un rol importante en la patogénesis de las IBD. Se ha reportado que la expresión constitutiva de TL1A en ratones transgénicos promueve el desarrollo de inflamación intestinal y fibrosis, además de otras patologías extra-intestinales con menor frecuencia (artropatía y lesiones ulcerosas en la piel). En estos ratones se observa un aumento de la activación de macrófagos, células dendríticas y células T CD4⁺ y CD8⁺, y una tendencia a la polarización Th1 y Th17. Además, el porcentaje de células T con receptores quimiotácticos para el intestino se ve aumentado (Shih et al., 2011).

Por otro lado, en dos modelos diferentes de ileitis crónica de ratón, la mucosa inflamada presentó un aumento en los niveles de TL1A y DR3 (especialmente de su variante no truncada) en comparación con los controles sanos. TL1A, principalmente expresado en células dendríticas CD11c^{high}, parecería actuar sobre células T CD4⁺ de memoria induciendo su proliferación y producción de IFN- γ por parte de las mismas en forma sinérgica con IL-12 e independientemente de IL-18 (Bamias et al., 2006).

En la colitis crónica inducida por DSS también se han reportado altos niveles de TL1A y DR3 en la mucosa intestinal. Estudios *in vitro* a partir de células T CD4⁺ aisladas de la mucosa indican que TL1A induce la proliferación de células Th1, productoras de IFN- γ , y de células Th17, productoras de IL-17, actuando solo o en forma sinérgica con IL-12 o IL-23 respectivamente. También se ha demostrado que TL1A posee un efecto inductor en la producción de IL-6 por las células Th17, actuando solo o en forma sinérgica con IL-23 (Takedatsu et al., 2008).

Estudios *in vitro* a partir de células T CD4⁺ de la mucosa de pacientes con EC han corroborado que existe una tendencia de polarización al fenotipo Th1 de las células T naïve, observándose un aumento de los niveles de IFN- γ y citoquinas Th1 (Fais et al., 1994; Parronchi et al., 1997). En sangre, la proporción de células Th1 y Th17 y sus respectivas citoquinas se ve aumentada en pacientes con EC en comparación con los individuos sanos, mientras que la proporción de células Tregs se ve disminuida al igual que los niveles séricos de TGF- β (Chao et al., 2014).

En cuanto a los factores genéticos que influyen sobre la EC, se han descrito haplotipos del gen TNFSF15 (codificante para TL1A) de alto riesgo para el desarrollo de esta enfermedad en pacientes de grupos étnicos diferentes (Michelsen et al., 2009; Tremelling et al., 2008; Yamazaki et al., 2005). Estas variantes de TL1A se sobreexpresan tras diferentes estímulos, induciendo a su vez la expresión exacerbada de citoquinas proinflamatorias en respuesta al reconocimiento de ligandos vía PRRs (Hedl and Abraham, 2014). De hecho, se ha reportado una sobreexpresión de TL1A en macrófagos de la lamina propia de pacientes con EC (Kamada et al., 2010), además de una expresión importante de IL-12 (Parronchi et al., 1997) e IL-23 (Kamada et al., 2010), las cuales son importantes en la diferenciación y activación de células T.

Los elevados niveles séricos de TL1A en las IBD resultan atractivos para su empleo en el diagnóstico y el seguimiento de estas enfermedades. Sin embargo, su utilidad como marcador de actividad aún se encuentra en discusión. La existencia de diferencias entre los niveles en la etapa de actividad y de remisión de la enfermedad no se encuentra demostrada, ya que se han obtenido resultados contradictorios en pacientes con colitis ulcerosa de grupos étnicos diferentes (Bamias et al., 2010; Song et al., 2013).

Futuros estudios que lleven a un mejor entendimiento de la patogénesis de las IBD son necesarios para el desarrollo de nuevas metodologías para el diagnóstico y el seguimiento de estas enfermedades, así como

para su tratamiento. Actualmente no está claro el rol de TL1A en estas enfermedades y son necesarios más estudios para evaluar su potencial como biomarcador en las mismas. Para ello es importante disponer de técnicas de detección robustas, sensibles y de bajo costo para TL1A.

1.6 VHHs: características y ventajas para su utilización en biotecnología

La técnica de ELISA (del inglés: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) es una de las metodologías de detección y cuantificación de proteínas más accesibles que existen actualmente. Para este fin, normalmente se utiliza un formato de ELISA no competitivo denominado “tipo sándwich”, en el cual los anticuerpos utilizados reconocen dos o más epítopes de la proteína (según se utilicen anticuerpos monoclonales, o alguna preparación policlonal). El anticuerpo (o anticuerpos, si se trata de una preparación policlonal) que se adsorbe a la placa de ELISA directamente se denomina “anticuerpo de captura” del analito, y el anticuerpo que se agrega tras la adición del analito, se denomina “anticuerpo de detección”. Este último suele estar conjugado a una molécula o epítope que permite su detección por un anticuerpo comercial u otro tipo de molécula, los cuales suelen conjugarse a una enzima que en contacto con su sustrato y un indicador de pH genera una señal colorimétrica medible del ensayo.

La producción a gran escala de los anticuerpos monoclonales usualmente utilizados para este fin es costosa y requiere de equipamiento y mano de obra especializada, y muchas veces los anticuerpos obtenidos no resultan ser estables en condiciones variables de pH o temperatura (lo cual es algo deseable cuando se desea comercializar los mismos, ya que se deben tener en cuenta las condiciones de traslado y de conservación). Esto deriva en que muchas veces no se consigan ensayos robustos, derivando en falta de reproducibilidad de resultados inter-laboratorios. Este es el caso de los ensayos actualmente disponibles para TL1A, como se discutirá al final de este trabajo.

Los camélidos y algunos peces cartilaginosos producen, además de anticuerpos convencionales, anticuerpos carentes de cadenas livianas y del dominio CH1. Esto implica que el sitio de unión al antígeno está compuesto por un solo dominio (el extremo N-terminal de la cadena pesada), denominado VHH o *nanobody* en el caso de los anticuerpos de camélidos (fig. 4), el cual tiene un tamaño aproximado de 15 kDa (Harmsen and De Haard, 2007).

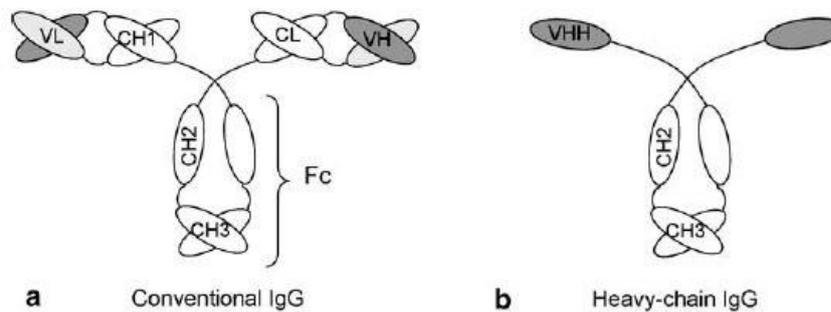


Figura 4. Diagrama esquemático de las estructuras de (a) un anticuerpo convencional y (b) un anticuerpo de cadena pesada. El anticuerpo convencional está formado por dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas, donde el sitio de unión al antígeno se encuentra formado por los dominios VH y VL de las cadenas pesada y liviana respectivamente. El anticuerpo de cadena pesada está compuesto únicamente por dos cadenas pesadas, cada una de las cuales consta de un dominio variable (VHH) encargado del reconocimiento del antígeno. Adaptado de (Harmsen and De Haard, 2007).

Los anticuerpos de cadena pesada de camélidos presentan numerosas ventajas para su aplicación en biotecnología con respecto a los anticuerpos convencionales. Debido a la naturaleza mono-dominio de los VHHs, su manipulación genética es sencilla y además pueden ser producidos en forma recombinante obteniéndose buenos niveles de expresión en sistemas procariontes, lo que abarata sensiblemente el costo de producción y simplifica el procedimiento (Harmsen and De Haard, 2007). Asimismo presentan gran versatilidad de ser fusionados a secuencias o *tags* útiles para diversos fines (como se mostrará a lo largo de este trabajo), sin que esto implique cambios en su producción y purificación.

También presentan otras ventajas, como una elevada estabilidad fisicoquímica y una alta solubilidad, debido al gran número de residuos hidrofílicos en sus secuencias aminoacídicas (Harmsen and De Haard, 2007). En esto difieren de los anticuerpos convencionales, los cuales presentan una interfase hidrofóbica en FR2 entre VL y VH que promueve su agregado (Vanlandschoot et al., 2011). Por otra parte, los VHHs presentan una gran estabilidad térmica, siendo capaces de mantener su actividad luego de ser incubados a altas temperaturas, lo cual se ha relacionado a una mayor resistencia a la desnaturalización y/o a un replegamiento eficiente luego de la misma (Harmsen and De Haard, 2007). Su elevada estabilidad los convierte en reactivos muy atractivos para su empleo en diversos tipos de inmunoensayos haciéndolos fácilmente comercializables en formato kit.

Estructuralmente los VHHs contienen, al igual que los dominios VH convencionales, cuatro regiones estructurales o FRs y tres regiones determinantes de complementariedad o CDRs, involucradas en el reconocimiento del antígeno (Harmsen and De Haard, 2007). El CDR3 de los VHHs posee gran capacidad de formar extensiones convexas pudiendo reconocer sitios antigénicos ocultos para los anticuerpos convencionales (por ejemplo: sitios activos de enzimas). Este CDR3 suele ser dos o tres veces más largo que el de los anticuerpos convencionales, pudiendo estar compuesto por hasta 18-24 aminoácidos (Wesolowski et al., 2009).

Debido a sus múltiples ventajas, los VHHs han sido extensamente estudiados desde su descubrimiento en 1989 para su utilización en distintas aplicaciones biotecnológicas, como el desarrollo de reactivos de laboratorio o su utilización en tratamientos clínicos. Por ejemplo, se han aislados VHHs neutralizantes para TNF- α que han sido exitosamente probados en un modelo de CIA en ratones (Coppieters et al., 2006). En cuanto al desarrollo de herramientas de detección cuantitativas, el crecimiento en el área ha sido relativamente lento (Muyldermans, 2013), y aún no hay ningún ensayo disponible comercialmente. Esto se debe a que los *nanobodies* tienden a desnaturalizarse al ser adsorbidos sobre superficies sólidas debido a su pequeño tamaño, a diferencia de los anticuerpos convencionales. Sin embargo, la facilidad de manipulación y modificación de los *nanobodies* ha permitido la introducción de péptidos *tag* alejados del paratope con la finalidad de que la modificación química no lo inactive, y asimismo esto permite la inmovilización orientada sobre las superficies, asegurando una máxima capacidad de captura del antígeno. Esto ha permitido el uso de *nanobodies* para el desarrollo de inmunoensayos para el diagnóstico de cisticercosis por *Taenia solium* (Deckers et al., 2009), la detección y cuantificación de la toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* (Li et al., 2014b), la detección del virus Influenza H5N1 (Zhu et al., 2014), o la cuantificación de la prealbúmina humana en suero como marcador de malnutrición e infecciones agudas (Ma et al., 2014). En nuestro laboratorio se tienen antecedentes en el área,

habiéndose desarrollado un ensayo de ELISA tipo sándwich para la detección de la epoxi-hidrolasa (Rossotti et al., manuscrito en preparación).

1.7 Objetivos

Como se ha descrito anteriormente, TL1A se encuentra sobreexpresado en distintas enfermedades autoinmunes e inflamatorias, muchas de las cuales actualmente no pueden ser diagnosticadas de forma rápida y eficiente por no existir un marcador específico de las mismas. Debido a esto el comienzo del tratamiento suele verse retrasado, lo que implica una desventaja en el pronóstico del paciente. Por otro lado, la carencia de un indicador que se correlacione directamente con la actividad de la enfermedad dificulta el establecimiento de tratamientos efectivos para cada paciente en particular. A partir de la bibliografía consultada, TL1A podría constituir un marcador útil tanto en el diagnóstico como en el seguimiento de enfermedades inflamatorias crónicas (o autoinmunes), ya que sus niveles séricos se encuentran elevados en pacientes en fase activa de estas enfermedades, y descienden al remitir la inflamación espontáneamente o tras un tratamiento exitoso.

En los últimos años, TL1A ha sido estudiado extensamente en relación a su rol en la patogénesis de distintas enfermedades, midiéndose sus niveles en suero y otros tejidos. Para ello, se encuentran disponibles

actualmente distintos kits de ELISA comerciales para TL1A humano soluble, los cuales se han desarrollado a partir de anticuerpos convencionales, con el alto costo económico que esto conlleva. Sin embargo, solamente uno de ellos ha sido utilizado en varios trabajos científicos publicados. Además, los kits desarrollados hasta el momento están disponibles solamente para actividades de investigación y no para uso clínico rutinario.

El creciente interés en el seguimiento de los niveles séricos de TL1A en pacientes con este tipo de enfermedades, ya sea con fines clínicos o de investigación, genera la necesidad de desarrollar un nuevo ensayo que sea más robusto y que reduzca los costos de los kits de ELISA disponibles actualmente, para poder ser transferido exitosamente a los sistemas de salud públicos y privados.

1.7.1 Objetivo general

Generación de un ensayo de ELISA robusto y con alta sensibilidad para TL1A humano utilizando *nanobodies*, que pueda ser potencialmente utilizado como una herramienta en el diagnóstico y en el seguimiento de diferentes enfermedades autoinmunes o inflamatorias crónicas.

1.7.2 Objetivos específicos

- ❖ Selección de *nanobodies* anti-TL1A de una biblioteca en fagos filamentosos obtenida a partir de una llama inmunizada con hTL1A.
- ❖ Subclonaje de clones seleccionados a vectores de expresión procariota.
- ❖ Expresión y purificación de diferentes *nanobodies*.
- ❖ Selección de pares de *nanobodies* apropiados para el ensayo de ELISA tipo sándwich.
- ❖ Optimización del ELISA con el/los pares de *nanobodies* seleccionados.
- ❖ Evaluación del ensayo de ELISA desarrollado utilizando suero comercial humano adicionado con hTL1A.
- ❖ Comparación del ensayo de ELISA generado con el kit comercial disponible.

2 MATERIALES Y METODOS

2.1 Buffers y soluciones

- **PBS 10x:** 2 g KCl, 11 g Na_2HPO_4 y 80 g de NaCl en agua destilada c.s.p. 1 litro, pH 7,5.
- **TAE 50x:** 242g Tris base, 57,1 mL ácido acético glacial y 100 mL EDTA 0,5 M en agua ultrapura de tipo 1 (según norma ISO 3696) c.s.p. 1 litro, pH 8,0.
- **TBS 10x:** 60,6 g Tris y 87,6 g NaCl en agua ultrapura de tipo 1 c.s.p. 1 litro, pH 7,6.
- **Buffer de carga 6x para geles de agarosa:** 0,7 mL TAE 50x, 1,5 mL glicerol y 12,5 mg azul de bromofenol en agua ultrapura de tipo 1 c.s.p. 5 mL.
- **Buffer de corrida 10x para SDS-PAGE:** 30,2 g Tris base, 144 g Glicina (calidad electroforesis) y 10 g SDS en agua destilada c.s.p. 1 litro.
- **Buffer de carga 6x para SDS-PAGE:** 0,35 M Tris-Cl, 10% SDS, 30% v/v glicerol, 0,175 mM azul de bromofenol y 0,1 M DTT.
- **Buffer de lavado para cromatografía de afinidad 1x (buffer A):** 20 mM imidazol, 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, pH 8.

- **Buffer de elución para cromatografía de afinidad 1x (buffer B):** 500 mM imidazol, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8.
- **Solución colorante para la tinción con azul de Coomassie:** 0,1% Coomassie blue, 10% ácido acético y 40% metanol.
- **Solución decolorante para la tinción con azul de Coomassie:** 7,5% v/v ácido acético y 5% v/v metanol.
- **Sustratos para la enzima peroxidasa (revelado de ELISA):**
 - **TMB:** 200 µL de solución 6 mg/mL de TMB (#T2885, Sigma) en DMSO, 50 µL de H₂O₂ 1% y 12,5 mL de buffer acetato 0,1 M pH 5,5.
 - **ABTS:** 1 mg de ABTS (#AD0002, Bio Basic) en 10 mL de buffer citrato-fosfato 0,05 M pH 5 y 40 µL de H₂O₂ 3%.
 - **OPD:** Una tableta de OPD (#34006, Thermo Scientific) diluida en 50 mL de agua ultrapura de tipo 1. Se agregan 4 µL de H₂O₂ 30% cada 10 mL de sustrato.

2.2 Medios de cultivo

- **LB:** #L3152, Sigma.
- **LB agar:** #L3027, Sigma.
- **SB:** 30 g triptona (#T7293, Sigma), 20 g extracto de levadura (#09182, Sigma), 10 g MOPS (#M3183, Sigma), en agua ultrapura de tipo 1 c.s.p. 1 L, pH 7,0.

- **SOC:** 20 g triptona, 5 g extracto de levadura, 0,5 g NaCl, en agua ultrapura de tipo 1 c.s.p. 1 L, pH 7,0. Luego de autoclavar agregar 10 mL de $MgCl_2$ 1 M y 20 mL de glucosa 1 M previamente filtrados.

2.3 Inmunización de llama y generación de biblioteca

Estas etapas fueron realizadas previo al comienzo de la tesina de grado, sin embargo se describen brevemente a continuación.

Se inmunizó una llama hembra adulta del Parque Lecocq con TL1A humano recombinante en adyuvante incompleto de Freud, administrándose aproximadamente 600 μ g de la proteína en cada dosis. La proteína fue producida en el laboratorio siguiendo el protocolo descrito previamente (Zhan et al., 2009). El plásmido fue cedido cordialmente por el Dr. S. Almo (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY), así como alícuotas de la proteína recombinante producida en su laboratorio.

El cronograma de inmunización constó de una primera dosis al día 0 seguido de 6 dosis separados por 4-5 semanas. La misma llama fue inmunizada simultáneamente con otras dos proteínas (hPD1 y CABLV), utilizando de cada una aproximadamente la misma cantidad que de TL1A. Tres semanas luego de la última dosis se recolectaron 150 mL de sangre del animal para generar la biblioteca. Para ello, los leucocitos

mononucleares de sangre periférica fueron purificados mediante separación por gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (#10771, Sigma). La extracción de ARN total de dichos leucocitos se llevó a cabo empleando el reactivo TRIZOL (#15596-026, Ambion) a partir de 4×10^7 células según las instrucciones del fabricante. El ADNc fue sintetizado empleando el kit de RT-PCR *superscript III first-strand synthesis system* (#18080-051, Invitrogen) y el cebador reverso JH (Tabla III). Los fragmentos de ADN que codifican para los VHHs fueron amplificados por PCR usando un mix de 3 cebadores directos: VH1, VH3 y VH4 (tabla III). Tanto los cebadores directos como el reverso contienen sitios de restricción para la enzima Sfil en sus extremos 5', que al ser cortados generan extremos cohesivos no complementarios entre sí, permitiendo el clonado de los VHHs de forma dirigida en todos los vectores que se utilizarán en este trabajo, como se explicará en detalle a continuación.

Tabla III. Cebadores utilizados para la amplificación de los genes de los VHHs. Se utiliza un mix de cebadores directos que amplifica para las distintas familias de VHHs (VH1, VH3 y VH4) y un cebador reverso genérico (JH). Todos los cebadores contienen un sitio de restricción para Sfil (subrayado).

Cebador	Secuencia
VH1	5'-CATGCCATGACTCGC <u>GGCC</u> CAGGCGGCCATGGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG-3'
VH3	5'-CATGCCATGACTCGC <u>GGCC</u> CAGGCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG-3'
VH4	5'-CATGCCATGACTCGC <u>GGCC</u> CAGGCGGCCATGGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGG-3'
JH	5'-CCACGATTCT <u>GGCC</u> GGCCTGGCCTGAGGAGACRGTGACCTGGGTCC-3'

El sitio de reconocimiento de Sfil es el siguiente: GGCCNNNN/NGGCC, donde N puede corresponder a cualquiera de las 4 bases del ADN. La barra indica el sitio de corte, que como se puede observar puede o no ser palindrómico. De esta forma los vectores o plásmidos que actuarán como “receptores” de los VHHs tendrán dos sitios de corte Sfil diferentes en su sitio de clonaje que expondrán, por lo tanto, extremos cohesivos diferentes al ser cortados con Sfil: el sitio de corte 5’ será siempre: GGCCAG/CGGCC (sitio 1), y el sitio de corte 3’ será: GGCCAGGC/CGGCC (sitio 2). Si al amplificar los VHHs se agrega la secuencia del sitio 1 al extremo 5’ del cebador directo, y la secuencia 2 al cebador reverso, al cortar el fragmento amplificado se podrá clonar de forma dirigida en el vector deseado.

Siguiendo en esta línea, los VHHs fueron clonados en el vector fagémido pComb3X (fig. 5), cedido gentilmente por el Dr. Barbas (The Scripps Research Institute, La Jolla, USA), tras su digestión con Sfil (#R01235, NEB). El VHH clonado en este vector se expresa fusionado a la proteína de cápside pIII del fago, de forma que queda expuesto hacia el exterior de la partícula viral. Además el vector contiene una señal de localización periplasmática (OmpA) asociada al Nt del gen del VHH, y dos *tags* que se encuentran localizados entre la secuencia del VHH y la de pIII. Estos *tags* permiten tanto la detección como la purificación de la proteína, y consisten de una cola de 6 histidinas (6xHis) y un epítipo de hemaglutinina (HA), al cual utilizaremos como medio para la detección del

VHH soluble en ELISA. Debido a la proteólisis de la proteína de fusión, el VHH (separado de pIII) también puede encontrarse en el sobrenadante del cultivo de bacterias transformadas con el fagémido, así como de forma soluble en el periplasma de las mismas. Sin embargo, los niveles de expresión de VHH soluble sin fusionar que se logran a partir de este vector son bajos, aunque suficientes para realizar pruebas de reactividad de los VHHs en ELISA. La transcripción del gen de los VHHs se encuentra bajo regulación del promotor del operón lac, el cual se induce en presencia de algunos compuestos como el IPTG.

El vector ligado con los genes de los VHHs fue electroporado en células *E. coli* ER2738 (#60522, Lucigen Corporation), tras lo cual se produjeron partículas virales infectando a las bacterias transformadas con fago *helper*, cuyo genoma provee del resto de proteínas de la cápside así como de pIII sin fusionar, pero carece de una señal de encapsidación eficaz. Por estas razones se consiguen producir partículas virales que expresan algunas copias de pIII (una o dos) fusionadas a los VHHs, y dentro de cada partícula viral se encapsida la información genética proporcionada por el plásmido pComb3X con la secuencia del VHH que está siendo expresado en la cápside viral. Se debe tener en cuenta que en el proceso de electroporación cada célula bacteriana recibe un solo plásmido pComb3X y por lo tanto contiene una sola secuencia de VHH, por lo cual cada célula bacteriana producirá partículas virales que expresarán un único clon de VHH en la cápside fusionado con pIII y

contendrán la información genética correspondiente al mismo en su interior.

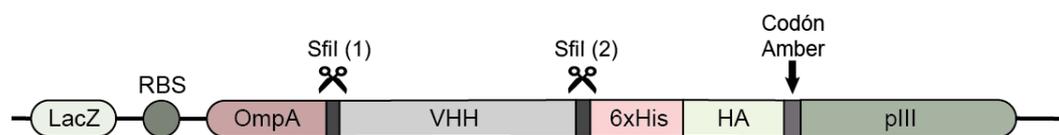


Figura 5. Diagrama esquemático del cassette de expresión del vector pComb3X. La expresión del VHH se encuentra regulada por el promotor del operón lac, el cual es inducido en presencia de IPTG. El VHH se expresa asociado a una secuencia señal de localización periplasmática (OmpA), a dos *tags* (una cola de 6 histidinas y un epítipo HA) y al dominio Nt de la proteína minoritaria de cubierta del fago (pIII). Entre el epítipo HA y pIII se encuentra un codón Amber que permite la expresión del VHH en forma libre en una cepa no supresora, aunque esto último no se realiza en este trabajo. Modificado de (Barbas, 2001).

2.4 Pannings

Para aislar VHHs específicos contra TL1A de la biblioteca de fagos generada, se realizaron varias rondas de selección sucesivas. Dichas rondas de selección (o *pannings*) se realizaron en pocillos de ELISA sensibilizados con hTL1A a 4°C durante 16-18 horas (ON). El número de pocillos sensibilizados y la concentración de TL1A utilizada variaron según la ronda de *panning*. Luego de la sensibilización, los pocillos se bloquearon con 300 µL de BSA 3% (#A2153, Sigma) en PBS durante 1 hora a 37°C. Después de lavar con PBS-Tween 0,05% (PBS-T), los pocillos se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación con 100 µL de la biblioteca (en la primera ronda de *panning*), o con 100 µL del *output* amplificado de la ronda de *panning* anterior (en las

rondas sucesivas). Luego de la incubación con los fagos, se realizaron 3 tandas de 8 lavados cada una con PBS-T, separadas por 5 minutos de agitación a temperatura ambiente (con excepción de algunos casos en los cuales se especifican las diferencias), para eliminar los fagos que expresaran VHHs sin especificidad por TL1A. Posteriormente se eluyeron aquellos específicos por TL1A incubando cada pocillo con 100 μ L de tripsina (#T4799, Sigma) a 10 mg/mL en TBS durante 30 minutos a 37°C. Luego de pipetear 10 veces vigorosamente el contenido de los pocillos, se separó el eluido y se le adicionaron 10 μ L de inhibidor de tripsina (#T9253, Sigma) a 100 mg/mL. La fracción eluída de fagos (*output*) se utilizó para su amplificación, cuantificación o monitoreo (*screening*) de clones específicos para TL1A.

Se realizaron dos rondas de selección, amplificando la fracción de fagos eluída de la primera y utilizándola para la siguiente. De esta forma el segundo *output* se encontrará más enriquecido en fagos con VHHs específicos para TL1A que el anterior.

2.4.1 Amplificación de los *outputs*: Para amplificar el *output* de una ronda de *panning* y utilizarla en una próxima ronda de selección, se incubaron 150-300 μ L del *output* con 2 mL de *E. coli* ER2738, previamente crecidas en SB hasta una DO medida a 600 nm de 0,8-1 UA, a 37°C durante 30 minutos, permitiendo así la infección de las bacterias

por las partículas virales. Posteriormente el cultivo infectado se llevó a 12 mL finales con SB-ampicilina a 33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (#A9393, Sigma) y se incubó a 37°C con agitación (250-300 rpm) durante 1 hora, para luego adicionar ampicilina hasta una concentración final de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e incubar 1 hora más en las mismas condiciones. Posteriormente se agregaron 50 μL de fago *helper* M13KO7 (10^{12} pfu/mL) (Pharmacia Biotech), y se incubó 2 horas en iguales condiciones. Por último se agregó Kanamicina (#60615, Sigma) hasta una concentración final de 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y se incubó a 37°C con agitación ON. Al día siguiente el cultivo se centrifugó a 20018 g durante 20 minutos, obteniendo las bacterias en el precipitado (*pellet*) y los fagos amplificados en el sobrenadante. Este último se incubó durante 1 hora en hielo con 0,2 volúmenes de una solución de PEG al 20% y NaCl 2,5 M para precipitar los fagos, y tras su centrifugación (20018 g, 20 min, 4°C), el *pellet* de partículas virales se resuspendió en 1 mL de BSA 3% en PBS. Para evitar posibles contaminaciones con células bacterianas remanentes, la preparación se filtró por 0,22 μm , y se añadieron inhibidores de proteasas (#13744100, Roche; stock 25x: 1 tableta disuelta en 2 mL de H₂O), para evitar la degradación de la cápside.

2.4.2 Titulación de los *outputs*: Para la cuantificación de los *outputs* y de sus correspondientes amplificados se infectaron distintas alícuotas de 100 μL de bacterias *E. coli* ER2738 (de la misma forma que la descrita para la amplificación) con diluciones seriadas de los fagos

correspondientes y posteriormente se plaquearon en placas de LB agar-ampicilina (100 µg/mL). Al día siguiente se contabilizaron las colonias obtenidas y se realizó el cálculo correspondiente tomando en cuenta las diluciones realizadas. El valor final de cuantificación se expresó en partículas virales/mL (pfu/mL).

2.4.3 Rondas de *panning* y *screening* de clones específicos para

TL1A: En la primera ronda de selección (ronda 1) se utilizaron 6 pocillos sensibilizados con TL1A a 10 µg/mL. Luego del bloqueo, cada pocillo se incubó con 100 µL de la biblioteca. Para la amplificación del *output* se utilizaron 300 µL del mismo para infectar 2 mL de *E. coli* ER2738.

La siguiente ronda de selección (ronda **2A**) se realizó en 3 pocillos de ELISA sensibilizados con TL1A a 10 µg/mL. Luego del bloqueo, se incubó con 100 µL/pocillo del *output* amplificado de la ronda 1.

A partir de las colonias aisladas en placas de LB agar-ampicilina obtenidas en la cuantificación del *output* 2A, se realizó un *screening* de clones específicos para TL1A, para lo cual se seleccionaron 10 colonias al azar y se crecieron en SB hasta una DO a 600 nm de 0,5 UA (a 37°C con agitación). Se indujo la expresión de los VHHs adicionando IPTG (#12481C50, Gold Biotechnology) a una concentración final de 1 mM, incubando a 37°C ON con agitación (250-300 rpm). Al mantener el estado de inducción durante tantas horas se busca, por un lado, maximizar la

producción del VHH en el perioplasma, y por otro, llegar al estado estacionario de crecimiento del cultivo en el cual muchas bacterias mueren, liberando al sobrenadante su contenido intracelular. De esta forma, al día siguiente se centrifugan las bacterias y se colecta el sobrenadante que contendrá cantidades suficientes para el *screening* de VHH producido por células que han muerto.

A partir del sobrenadante de los VHHs producidos se realizó un *screening* en ELISA de clones específicos contra TL1A, y contra las otras proteínas utilizadas en la inmunización de la llama (hPD1 y CABLV), en pocillos sensibilizados ON a 4°C con 100 µL de dichas proteínas a una concentración de 1 µg/mL y posteriormente bloqueados con 300 µL de PBS-BSA 1% durante 1 hora a 37°C. Luego de lavar con PBS-T, los pocillos se incubaron con una dilución al medio de los sobrenadantes de los distintos clones en PBS-BSA 1% durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Se lavó con PBS-T y tras la incubación con anti-HA-HRP se reveló con la solución de TMB previamente descrita.

A partir del *output* amplificado de la ronda 1 se realizó una nueva ronda de *panning*, probando dos condiciones de sensibilización diferentes: TL1A a 10 µg/mL (ronda **2B**) o a 0,5 µg/mL (ronda **2C**), utilizando 3 pocillos para cada caso. Luego del bloqueo, se incubó con 100 µL/pocillo del *output* amplificado de la ronda 1. Posteriormente se realizaron rondas de lavados exhaustivos con PBS-T que duraron casi 4 días en total, constando de series de 8 lavados cada 4 a 8 horas. Los *outputs* obtenidos en ambas

condiciones se cuantificaron y amplificaron como ya describió. El *screening* de clones específicos de estos *outputs* se realizó de la forma anteriormente descrita.

2.5 Clonaje del *output* del *panning* a vectores de expresión

Los clones obtenidos a partir de la ronda de *panning* 2C (sección 2.4.3) fueron clonados desde el vector pComb3X a vectores que permitieran mayores niveles de expresión de los mismos y/o su fusión a secuencias de interés.

Se utilizaron dos vectores modificados de los vectores pET, donde la expresión del gen clonado (gen blanco) se encuentra regulada por el promotor de la ARN polimerasa T7 (fig. 6). Los vectores se transformaron en una cepa de *E. coli* con el gen de la ARN polimerasa T7 inserto en el genoma bacteriano (*E. coli* BL21-DE3, preparadas en el laboratorio), cuya expresión está regulada por el promotor del operón lactosa. Además, la expresión del gen blanco a partir del promotor de la ARN polimerasa T7 también está regulado por el promotor del operón lac, lo cual asegura que el mismo no sea transcrito en caso de que se exprese una pequeña cantidad de ARN polimerasa T7 de forma espontánea. En presencia de un inductor del promotor del operón lac, como el IPTG, se induce la expresión de la ARN polimerasa T7 y la subsecuente expresión del gen blanco. Esta ARN polimerasa es muy específica de su promotor, el cual además es un

promotor fuerte, por lo tanto en este sistema se logra un alto nivel de expresión del gen blanco (en este caso el gen del VHH) de forma muy regulada.

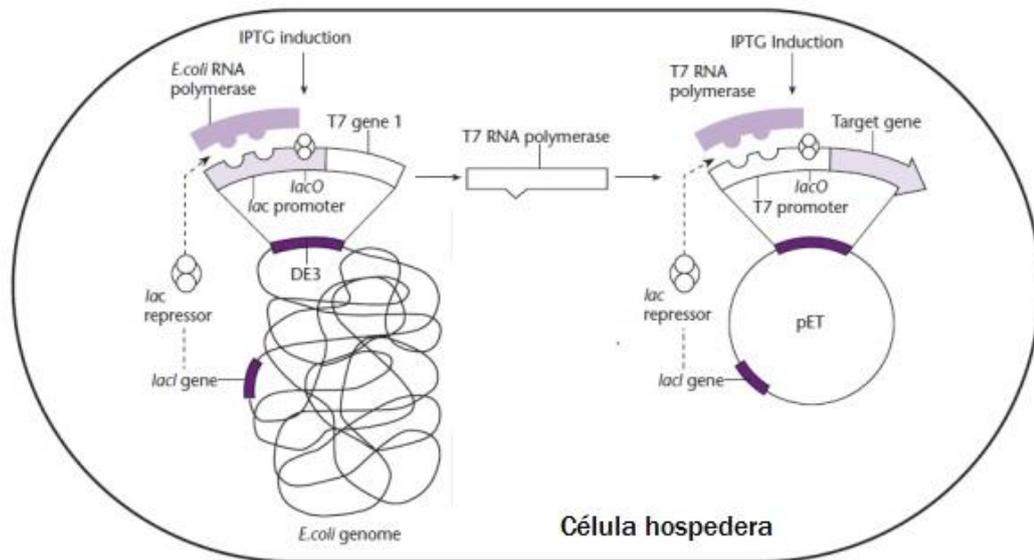


Figura 6. Sistema de expresión pET. En ausencia de IPTG el represor lac que se expresa a partir del gen lac I inhibe la expresión de la ARN polimerasa T7 y del gen blanco en el vector pET. La presencia de IPTG activa la transcripción de la ARN polimerasa T7 y ésta transcribe el gen clonado en el vector pET. Adaptado de Novagen Catalog, p.24, 1995 (Novagen, USA).

2.5.1 Vector pINQ-OmpA: Por un lado los VHHs se clonaron en el vector pINQ-OmpA (fig. 7), el cual es el vector pET28a(+) (#69864-3, Novagen) modificado, que contiene una secuencia señal OmpA (que se expresará en el extremo Nt de la proteína de interés), para el transporte de las proteínas al periplasma de la bacteria en forma soluble, y dos tags que permiten la purificación y la detección del VHH una vez expresado (una cola de 6 histidinas y un epítipo HA), en el extremo Ct. Los clones

obtenidos a partir de la ronda de *panning* 2C fueron clonados en este vector como se explica más adelante, y posteriormente se transformaron en la cepa de *E. coli* BL21 (Chapman-Smith et al., 1994), para llevar a cabo la expresión de los clones luego de la inducción con IPTG.



Figura 7. Diagrama esquemático del cassette de expresión del vector pINQ-OmpA. El VHH clonado entre los sitios de corte no homólogos de SfiI se expresa en forma soluble en el periplasma debido a la secuencia señal OmpA, y asociado a una cola de 6 histidinas y a un epítipo HA. La expresión del VHH está regulada por un promotor T7 inducible por IPTG.

2.5.2 Vector pINQ-BtH6: Los clones obtenidos a partir de la ronda de *panning* 2C también fueron clonados en el vector pINQ-BtH6 (fig. 8) para conseguir VHHs biotinilados *in vivo* como se explicará a continuación. Al igual que el pINQ-OmpA, este vector contiene una secuencia señal OmpA y el VHH se expresa asociado a una cola de 6 histidinas fusionada al extremo Ct del mismo. Además, presenta una señal de biotinilación de 15 aas entre la secuencia del VHH y la cola de 6 histidinas. La enzima biotina-ligasa birA cataliza la unión de una única molécula de biotina a esta secuencia. Por lo tanto, para que ocurra la biotinilación *in vivo* de los VHHs las bacterias deben expresar esta enzima. Esto se logra co-transformando el vector pINQ-BtH6 con otro vector (pCY-216) (Chapman-Smith et al., 1994), que codifica para la enzima biotina-ligasa birA en

forma inducible por arabinosa. Además, el vector pCY-216 confiere resistencia a cloranfenicol, por lo tanto las bacterias *E. coli* BL21 co-transformadas con los plásmidos pCY-216 y pINQ-BtH6 son crecidas en LB adicionado con kanamicina y cloranfenicol (#C0378, Sigma). A la cepa de *E. coli* BL21 transformada con el plásmido pCY-216 (resistente a cloranfenicol) la denominaremos: BL21-pBir. Esta cepa está disponible en el laboratorio en forma de células electrocompetentes, y por lo tanto fue utilizada para transformar con plásmidos pINQ-BtH6 codificantes para diferentes VHHs con el fin de biotinarlos.

Esta estrategia tiene la ventaja de que la biotinilación se realiza en forma controlada y dirigida, es decir, se adiciona una única molécula de biotina en el extremo Ct del VHH, evitando así la interferencia de la misma en la unión del VHH con su antígeno. En cambio, la biotinilación química de un VHH, que está compuesto básicamente por el dominio de unión al antígeno, deriva muchas veces en la pérdida de reconocimiento antigénico debido a que en este caso la adición de biotina no es un proceso sitio-dirigido.



Figura 8. Diagrama esquemático del cassette de expresión del vector pINQ-BtH6. El VHH clonado entre los sitios de corte no homólogos de SfiI se expresa en forma soluble en el periplasma debido a la secuencia señal OmpA, y asociado a una señal de biotinilación y a una cola de 6 histidinas. La expresión del VHH está regulada por un promotor T7 inducible por IPTG.

Trabajos previos en el laboratorio llevaron a la optimización del proceso de biotinylation de los VHHs producidos utilizando este sistema, ya que se había observado que la biotinylation *in vivo*, que se extiende el tiempo que dura la inducción de la producción de los VHHs en el cultivo bacteriano (4 horas), no era completamente eficiente. Por lo tanto, luego de pasado ese tiempo se continúa el proceso *in vitro*, etapa que denominaremos “post-biotinylation”. Para la misma, luego de las 4 horas de inducción con IPTG, las células se centrifugan y se resuspenden en PBS adicionado con exceso de biotina, para luego ser sonicadas. De esta manera se produce su lisis y se liberan los componentes intracelulares y periplasmáticos. Esto permite el encuentro físico de la enzima biotina-ligasa, que se localiza en el citoplasma, con los VHHs del periplasma. Luego de la sonicación se incuba la preparación durante 90 minutos a 37°C en rotación, permitiendo la acción de la enzima sobre los VHHs y lográndose la completa biotinylation de los mismos. La biotina se caracteriza por su unión con alta afinidad a la avidina y a la estreptavidina, por lo tanto los VHHs asociados a la biotina (VHHs-biot) son muy útiles para utilizar en ELISA ya que pueden unirse a la avidina (proteína que se utilizará en este trabajo en la sensibilización de las placas) o ser detectados con estreptavidina-HRP.

2.5.3 Clonaje del *output* de la ronda de *panning* 2C a los vectores de expresión: Para realizar los clonajes de los genes de los VHHs desde el vector pComb3X a los vectores de expresión procariotas descritos

anteriormente, se infectaron 0,5 mL de células *E. coli* ER2738a una DO_{600nm} de 0,8-1 UA con 100 μ L del *output* obtenido a partir de la ronda de *panning* 2C dejándose 30 minutos a 37°C, y tras la adición de 3,5 mL de SB-ampicilina (100 μ g/mL) se incubaron con agitación a 37°C durante toda la noche. Luego el cultivo se centrifugó, y a partir del *pellet* se aislaron los plásmidos pComb3X codificantes para los diferentes VHHs utilizando un kit comercial (#K0701, Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Posteriormente se digirieron 20 μ g de la minipreparación de plásmidos (miniprep) con 40 U de Sfil (#R01235, NEB) a 50°C durante 3 horas en un termociclador. Paralelamente se digirieron los vectores pINQ-OmpA o pINQ-BtH6 con la misma enzima, cortando en cada caso 20 μ g de vector con 40 U de Sfil. Los productos de las diferentes digestiones fueron corridos en un gel de agarosa (#R0492, Thermo Scientific) teñido con bromuro de etidio (#E1510, Sigma). El ADN proveniente de las bandas correspondientes a los VHHs y a los vectores se eluyó de la agarosa y se purificó mediante un kit comercial (#K0691, Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se realizó la ligación de los *nanobodies* (200 ng/ligación) con el vector deseado (1 μ g/ligación) en una relación molar de 3:1 (inserto:vector) durante 1 hora a 22°C utilizando 1,25 U/ligación de la enzima T4 ADN ligasa (#EL0011, Fermentas) en un volumen final de 10 μ L/ligación, y luego se inactivó la enzima incubando la mezcla durante 10 minutos a

65°C en un termociclador (BIORAD). Posteriormente se transformaron células competentes *E. coli* BL21 (clones en pINQ-OmpA) o *E. coli* BL21-pCY216 (clones en pINQ-BtH6) mediante electroporación con 1 µL de cada ligación, utilizando el equipo Micro Pulser™ (BIORAD) y cubetas de electroporación de 0,1 cm (BIORAD). Luego las bacterias se incubaron 1 hora a 37°C con agitación en 1 mL de SOC, y posteriormente se sembraron diluciones en placas de LB agar adicionado con los correspondientes antibióticos (kanamicina 40 µg/mL para los clones en pINQ-OmpA, y kanamicina 40 µg/mL-cloranfenicol 35 µg/mL para los clones en pINQ-BtH6). Las placas se dejaron a 37°C ON para permitir el crecimiento de colonias individuales.

2.5.4 Clonaje de VHHs individuales a vectores de expresión: En algunos casos fue de interés clonar VHHs aislados desde uno de los vectores de expresión procariota al otro. Para esto, los VHHs fueron crecidos ON en 3 mL de LB adicionado con los respectivos antibióticos a 37°C con agitación. A partir de estos cultivos se realizaron minipreparaciones del ADN plasmídico de partida utilizando un kit comercial (#K0503, Thermo Scientific). Posteriormente se llevaron a cabo PCRs utilizando cebadores que amplifican los genes de VHHs independientemente de sus secuencias (tabla IV), a partir de 2 µL de ADN (aproximadamente 100 ng) en un volumen total de 150 µL, dividido en tres tubos. La mezcla de PCR incluyó: 5 U de la enzima ADN Taq Polimerasa

(#EP0402, Thermo Scientific), 15 μ L del buffer 10x de dicha enzima (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,4), 3 μ L de cada uno de los cebadores (stock: 10 μ M), 3 μ L de mix de dNTPs (stock: 10 mM de cada dNTP), MgCl₂ (concentración final 1 mM) y H₂O c.s.p. 150 μ L. Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un termociclador (BIORAD), y las mismas constaron de los siguientes pasos: 95°C durante 1 minuto; 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C; y un último paso de 10 minutos a 72°C.

Tabla IV. Cebadores utilizados en las PCRs para amplificar los genes de los VHHs independientemente de sus secuencias. Hibridan en los sitios de restricción de la enzima Sfil (subrayado) que contienen todos los VHHs por la forma en que fueron amplificados inicialmente.

Cebador	Secuencia
Directo	5'-GTTACTCGC <u>GGCCCAGGCGGCC</u> ATG-3'
Reverso	5'-CCACGATTCT <u>GGCCGGCCTGGCCT</u> GAG-3'

Los productos de PCR se purificaron mediante un kit (#K0701, Thermo Scientific) y el eluido se concentró hasta un volumen final de 30 μ L. La concentración de ADN obtenida se midió por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm utilizando el equipo *NanoDrop 1000 spectrophotometer* (Thermo Scientific).

La totalidad del amplificado se cortó con la enzima Sfil (2U/ μ g de ADN) a 50°C durante 3 horas, en 40 μ L finales por reacción. Los productos de digestión se corrieron en un gel de agarosa, a partir del cual se realizó la

purificación del ADN de las bandas correspondientes a los VHHs, utilizando un kit comercial (#K0691, Thermo Scientific). La elución se realizó en 30 μL de H_2O , y se midieron las concentraciones de ADN obtenidas por espectrofotometría a 260 nm.

La reacción de ligación del vector con el inserto se realizó en un volumen final de 10 μL para cada clon, utilizando 1,25 U de la enzima T4 ADN ligasa (#EL0011, Fermentas) en el buffer proporcionado por el fabricante. Se utilizaron para cada reacción: 85 ng de vector pINQ-OmpA, o 120 ng de vector pINQ-BtH6 para 20 ng de inserto, manteniendo una relación molar inserto:vector de 3:1. Además se incluyó un control de religación en el cual la reacción se llevó a cabo en ausencia de inserto. Las mezclas de ligación se incubaron durante 1 hora a 22°C en un termociclador y luego durante 10 minutos a 65°C para inactivar la ligasa.

Se transformaron 30 μL de células *E. coli* BL21-DE3 con 1 μL del producto de ligación de cada clon mediante electroporación, utilizando el equipo Micro Pulser™ (BIORAD) y cubetas de electroporación de 0,1 cm. Luego las bacterias se incubaron 1 hora a 37°C con agitación en 1 mL de SOC, y posteriormente se plaquearon diluciones del cultivo en placas de LB agar con los correspondientes antibióticos. Las placas se dejaron a 37°C toda la noche para permitir el crecimiento de colonias. Posteriormente se seleccionaron colonias individuales para realizar expresión de los VHHs a pequeña escala y probar su reactividad contra TL1A en ELISA.

Los diferentes clones se mandaron a secuenciar al Servicio de Secuenciación de Ácidos Nucleicos del Institut Pasteur de Montevideo.

2.6 Expresión y purificación de VHHs

Una vez obtenidos los VHHs en los vectores pINQ-OmpA y pINQ-BtH6 se realizó la expresión a pequeña y gran escala de algunos de ellos para utilizar en diferentes ensayos.

2.6.1 Producción de VHHs biotinilados: Se realizaron producciones a pequeña y gran escala de distintos VHHs clonados en el vector pINQ-BtH6. En ambos casos se creció un cultivo del clon de interés a 37°C con agitación durante toda la noche en un volumen adecuado de LB-Kanamicina 40 µg/mL-Cloranfenicol 35 µg/mL, que permitiera realizar una dilución 1/100 del mismo en el volumen final de cultivo para realizar la producción. Para la producción del VHH biotinilado se adicionó, además de los respectivos antibióticos, Arabinosa al 0,04% para inducir la expresión de la biotina-ligasa birA, responsable de unir de forma covalente una biotina a la secuencia SFAJEFNREAJF asociada a cada VHH. Las producciones a gran escala se realizaron en 500 mL y las producciones a pequeña escala en 10-30 mL. Se dejó crecer el cultivo hasta una DO_{600nm} de 0,6-0,8 UA y se indujo la expresión del VHH con IPTG 3 µM (#12481C50, Gold Biotechnology), al mismo tiempo que se agregó D-Biotina (#0340, Amresco) a una concentración final de 100 µM.

Se incubó durante 4 horas a 37°C con agitación y posteriormente se centrifugó a 6.000 g por 15 minutos a 4°C. El *pellet* se resuspendió en PBS suplementado con un exceso de biotina (a una concentración final de 50 µM). Se sonicó en frío y se dejó 90 minutos a 37°C en rotación para permitir la biotilación de todos los VHHs. Posteriormente el sonicado se centrifugó a 20018 g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido, que contiene los VHHs-biot expresados en forma soluble, se purificó por columnas de Ni-NTA como se explicará en detalle más adelante, siendo este paso imprescindible para eliminar la biotina en exceso además de los restos bacterianos.

2.6.2 Producción de VHHs biotilados en bloques de cultivo: Para realizar el ranking de afinidades (sección 2.7), se realizaron producciones de clones biotilados en bloques de cultivo. Para ello se seleccionaron 94 colonias al azar de placas de LB agar con clones en el vector pINQ-BtH6 (transformado en BL21-pBir), y se produjeron en 2mL totales de cultivo cada uno, utilizando 4 bloques de cultivo de 96 pocillos (dispuestos de igual forma que los pocillos de una placa de ELISA) con capacidad máxima de 500 µL/pocillo. Dos pocillos de los bloques (en las posiciones D6 y D12) permanecieron sin inocular durante todo el procedimiento de inducción para controlar posibles contaminaciones inter-pocillos.

La producción de los VHHs-biot se llevó a cabo como se describió en el punto anterior. Luego de 4 horas de inducción con IPTG las bacterias se

centrifugaron y se resuspendieron en 500 μ L finales de PBS-biotina 50 μ M (se reunieron los pellets de cada clon en un solo bloque), tras lo cual se congelaron ON. Posteriormente se realizaron 3 ciclos más de congelado y descongelado, incubando el bloque durante cada descongelado en un baño sonicador durante 15 minutos. Los bloques se centrifugaron y los sobrenadantes se purificaron por columnas de Ni-NTA (Thermo Scientific) como se describe más adelante (sección 2.6.6). Los eluidos obtenidos de los distintos clones se utilizaron en el ranking de afinidades (sección 2.7).

2.6.3 Producción de VHHs sin biotinilar: Se realizaron producciones a pequeña y gran escala de distintos VHHs clonados en el vector pINQ-OmpA. En ambos casos se creció un cultivo de un determinado clon (en BL21-DE3) a 37°C con agitación durante toda la noche en un volumen adecuado de LB-Kanamicina 40 μ g/mL que permitiera realizar una dilución 1/100 del mismo en el volumen final de cultivo de la producción. Las producciones a gran escala se realizaron en 500 mL y las producciones a pequeña escala en 10-30 mL. Se dejó crecer el cultivo hasta una DO_{600nm} de 0,6-0,8 UA y la expresión del VHH se indujo con IPTG 3 μ M, tras lo cual se incubó durante 4 horas a 37°C con agitación, y posteriormente se centrifugó a 6.000 g por 15 minutos a 4°C. El *pellet* se resuspendió en PBS y se sonicó en frío, separando luego los restos celulares por centrifugación a 20018 g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido, en el cual se encuentran los VHHs expresados de

forma soluble, se purificó o se utilizó en forma directa para pruebas de reactividad en ELISA.

2.6.4 Producción de VHHs sin biotinilar en bloques de cultivo: Se seleccionaron 94 colonias al azar de placas de LB agar con clones en el vector pINQ-OmpA (BL21-DE3), y se produjeron en 500 μ L de cultivo cada uno, utilizando un bloque de 96 pocillos al igual que en el procedimiento descrito para los VHHs biotinilados. En este caso, el protocolo de inducción y el tratamiento de los cultivos es análogo a lo descrito en el punto anterior.

2.6.5 Purificación de VHHs producidos a gran escala por cromatografía de afinidad: Los sobrenadantes obtenidos de las producciones de VHHs a gran escala fueron adicionados con imidazol a una concentración final de 20 mM y con NaCl a una concentración final de 300 mM. Luego se filtró por 0,22 μ m, y se purificó por cromatografía de afinidad utilizando una columna de Ni-NTA (#17-5248-01, GE Healthcare) y el equipo ÄKTA *purification system* (GE Healthcare).

Para la purificación mediante el equipo ÄKTA primero se equilibró la columna a utilizar con buffer A (20 mM imidazol, 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, pH 8) y luego se cargó la muestra. La fracción de la misma que no quedó retenida en la columna se eluyó en el lavado que se realizó con

5mL de buffer A. Posteriormente, para eluir los componentes retenidos mediante interacciones débiles, se procedió a lavar la columna con un gradiente de imidazol creciente utilizando distintas cantidades de buffer B (500 mM imidazol, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8) en buffer A. Esto consistió en los siguientes lavados: 1) 5 mL de 4% de buffer B (lo que corresponde a una concentración final de 40 mM de imidazol), y 2) 5 mL de 6% de buffer B (es decir una concentración de 50 mM de imidazol). Tras dichos lavados se procedió a la elución del VHH, que se realizó utilizando 100% de buffer B, y posteriormente la columna se lavó con 5 mL de este buffer para asegurar la elución completa de los componentes proteicos y poder reutilizar la columna para una próxima purificación. Todo el proceso se monitoreó mediante espectrofotometría a 280 nm y el pico de absorbancia obtenido durante la elución con 100% de buffer B, que corresponde a la fracción proteica, se separó y se dializó contra PBS 1X durante 24 horas con cambios del buffer cada 6-8 horas. Luego el VHH se cuantificó por espectrofotometría a 280 nm utilizando el equipo *NanoDrop 1000 spectrophotometer* (Thermo Scientific). Los volúmenes finales de las eluciones tras la diálisis variaron según el clon purificado (entre 3 y 8 mL).

Las distintas fracciones obtenidas durante la purificación se visualizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (#A8887, Sigma) en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) teñidos con azul de

Coomassie. A partir de estos geles se evaluó el nivel de pureza de las fracciones correspondientes a los picos de elución de los VHHs.

Los clones expresados en el vector pINQ-OmpA que se utilizaron para la sensibilización en el ensayo de ELISA para TL1A (sección 3.8.2 de Resultados), fueron tratados previamente con una resina de agarosa asociada a estreptavidina (#20359, Thermo Scientific) de forma de asegurar la completa eliminación de biotina o de proteínas traza de *E. coli* que pudieran estar biotiniladas. Este paso es esencial porque este formato de ELISA se basa en el uso de la estreptavidina-HRP para el revelado, lo cual podría llevar a interferencias importantes en los resultados si se adsorben proteínas biotiniladas de *E. coli* en la placa (aunque sea en concentraciones muy bajas). Se trató 1 mL del clon purificado por cromatografía de afinidad con 150 μ L de la resina, se dejó incubando 1-2 horas a temperatura ambiente en rotación, y se centrifugó a máxima velocidad (27900 g) durante 20 minutos. El sobrenadante se filtró con un filtro de 0,22 μ m, y se midió la concentración por espectrofotometría a 280 nm.

2.6.6 Purificación de VHHs producidos a pequeña escala: Se utilizó el sistema de columnas de Ni-NTA (*HisPur Ni-NTA 96-Well Spin Plates*, #88230, Thermo Scientific), que consta de un bloque con 96 columnas de Ni-NTA dispuestas de igual forma que una placa de ELISA. Luego de

equilibrar las columnas con PBS, las muestras de VHHs se incubaron durante 15 minutos en las columnas, permitiendo su pasaje a través de las mismas por gravedad. Luego se realizaron 10 lavados con PBS, utilizando 200 μ L/columna en cada lavado. Las eluciones se realizaron con PBS-imidazol 500 mM, en un volumen final de 600 μ L. En algunos casos, los eluidos se dializaron contra PBS 1x durante 24 horas, realizando cambios del buffer cada 6-8 horas.

2.7 Ranking de afinidades

Para el ranking de afinidades se siguió un protocolo desarrollado en nuestro laboratorio anteriormente por el Lic. Rossotti (Rossotti, manuscrito en preparación). El ensayo consiste en una primera etapa en donde se busca normalizar las cantidades de VHHs presentes en cada pocillo de la placa de ELISA, y en una segunda etapa en la cual se compara la afinidad de los distintos clones por el ligando conjugado a la peroxidasa. Para ello se produjeron y purificaron 94 clones de VHHs clonados en el vector pINQ-BtH6 en bloque de 96 pocillos, como se describió anteriormente (secciones 2.6.2 y 2.6.6).

2.7.1 Ensayo de saturación: La primera etapa del ranking de afinidades se realizó con el fin de corroborar que las cantidades de VHHs que se emplearon en los pocillos de la placa de ELISA fueran iguales entre sí. Se

utilizó una placa de ELISA sensibilizada con 100 μ L/pocillo de avidina (#21128, Pierce-Thermo Scientific) a una concentración de 1 μ g/mL en PBS a 4°C ON. Luego de bloquear la placa con BSA 1% en PBS durante 1 hora a 37°C y lavar con PBS-T, se incubó con 100 μ L de una dilución al medio de los sobrenadantes de los clones biotinilados en PBS-BSA 1% durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Posteriormente la placa se lavó con PBS-T y se incubó con el anticuerpo anti-His-HRP (#ab1187, Abcam) a una dilución 1/10000 en PBS-BSA 0,2%-Tween 0,05% durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Se lavó y se reveló con la solución de TMB descrita anteriormente (sección 2.1), deteniendo la reacción a los 15 minutos y midiendo la absorbancia a 450 nm en el equipo FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Germany).

2.7.2 Conjugación de TL1A a la peroxidasa: La conjugación de TL1A a la peroxidasa (HRP o PO) se realizó utilizando una relación de 4 moles de PO para 1 mol del sustrato, para lo cual se utilizaron 250 μ g de TL1A y 2 μ g de PO activada. La activación de la PO se realizó a partir de 1 mg de la enzima en 400 μ L de buffer acetato 1 mM pH 4,2 y 100 μ L de periodato de sodio 100 mM. Se incubó 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y posteriormente la reacción se cortó con 15 μ L de etilenglicol. Se equilibró una columna NAP5 (#17-0853-02, GE Healthcare) con 20 mL de buffer acetato 1 mM pH 4,2, y se cargó la muestra en la columna. Se eluyó la PO con buffer acetato 1 mM pH 4,2 (visualizándose la misma

fácilmente por su color marrón), y se la recuperó al salir de la columna en aproximadamente 1 mL final (concentración aproximada de 0,5 mg/mL).

El TL1A, previamente dializado contra buffer carbonato 100 mM pH 9,5 ON y llevado a 1 mL en este buffer, se incubó con 5 μ L de PO activada (aproximadamente 2 μ g) durante 2 horas a temperatura ambiente en rotación. Posteriormente se agregaron 10 μ L de cianoborohidruro 5 M y se dejó incubando a 4°C ON. Para bloquear los sitios activos de la peroxidasa que no reaccionaron, se añadieron 50 μ L de etanolamina 1 M pH 9,6 y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se dializó contra PBS 0,25x y luego se concentró 4 veces en una centrífuga evaporadora (*Integrated Speedvac System ISS 100*, Savant).

2.7.3 Titulación de TL1A-peroxidasa: Para titular el TL1A conjugado a la peroxidasa (TL1A-PO), 6 clones en el vector pINQ-BtH6 fueron seleccionados aleatoriamente y producidos en 10 mL de cultivo. En primer lugar los clones producidos fueron titulados utilizando una placa sensibilizada con 100 μ L/pocillo de avidina 1 μ g/mL en PBS a 4°C ON, la cual luego de ser bloqueada con BSA 1% en PBS durante 1 hora a 37°C, fue incubada con los sobrenadantes partiendo de una dilución 1/5 y haciendo diluciones seriadas al medio en PBS-BSA 1%. Para revelar se utilizó anti-His-HRP y su correspondiente sustrato (TMB/H₂O₂). Se eligió la mayor dilución de los sobrenadantes de los clones a la cual todos

presentaron valores de absorbancia elevados (una saturación de la señal) para realizar la titulación del TL1A-PO generado. Para esto se utilizó una placa sensibilizada con 100 μ L/pocillo de avidina 1 μ g/mL en PBS a 4°C ON. Luego del bloqueo con BSA 1% en PBS durante 1 hora a 37°C y de lavar con PBS-T, se incubó cada fila de la placa con uno de los clones producidos en 10 mL a la dilución en la que todos presentaban saturación, en PBS-BSA 1%. Posteriormente se realizaron curvas de TL1A-PO, partiendo de una dilución 1/3200 del mismo, y haciendo diluciones seriadas al medio en PBS-BSA 1%. Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación, luego se lavó con PBS-T y se reveló con el sustrato de la peroxidasa. Para el ranking de afinidades se utilizó una dilución de TL1A-PO que generara una señal intermedia (DO_{450nm} de aproximadamente 1 UA) en este ensayo de titulación, de manera que fuera posible discriminar los clones con mayor afinidad por TL1A.

2.7.4 Comparación de afinidades de los distintos clones en ELISA:

Para la segunda etapa del ranking de afinidades se sensibilizó una placa de ELISA con 100 μ L/pocillo de avidina 1 μ g/mL en PBS a 4°C ON. La placa se bloqueó con BSA 1% en PBS 1 hora a 37°C, y luego de lavar con PBS-T, se incubó con 100 μ L por pocillo de una dilución al medio de cada clon en PBS-BSA 1%-Tween 0,05%. Posteriormente se lavó y se incubó con la dilución adecuada de TL1A-PO en PBS-BSA 1%-Tween 0,05% durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Luego de

lavar con PBS-T, se reveló con el sustrato de la peroxidasa deteniendo la reacción a los 15 minutos y midiendo la absorbancia a 450 nm en el equipo FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Germany).

2.8 ELISA sándwich para TL1A

En este trabajo se probaron 3 formatos distintos de ELISA sándwich para TL1A, los cuales se esquematizan en la figura 9. Por un lado, se utilizó el VHH de captura biotinilado sobre placas pre-adsorbidas con avidina. Luego de la incubación con TL1A, se incubó con el VHH de detección con un epítipo HA, el cual es reconocido por un anticuerpo anti-HA-HRP (figura 9 A). Este formato también fue ensayado sin utilizar a la avidina como proteína de *coating* (figura 9 B). Por otro lado, se utilizó el formato inverso en el cual el VHH de captura está expresado en el vector pINQ-OmpA y el VHH de detección se encuentra biotinilado, por lo tanto es capaz de ser reconocido por la estreptavidina-HRP (figura 9 C).

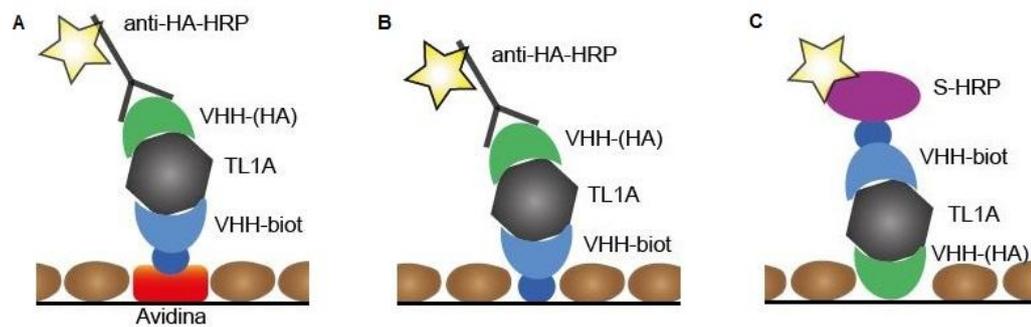


Figura 9. Esquema de los formatos de ELISA ensayados. Se representan pocillos de placas de ELISA, sensibilizados con distintas proteínas y bloqueados con BSA (en marrón). Se representa a la avidina (en rojo), y a los VHHs biotinilados (en azul) o asociados al epítipo HA (en verde). La peroxidasa se representa en forma de estrella, asociada a la estreptavidina o al anticuerpo anti-HA.

El protocolo de ELISA utilizado fue básicamente el mismo para todos los formatos ensayados. Las placas de ELISA (# 655061, Greiner) fueron sensibilizadas a 4°C ON (16-18 horas), con el VHH o con la avidina según el caso, diluidos en PBS a concentraciones variables según el ensayo. Luego de la sensibilización, se lavó 3 veces con PBS-T y se bloqueó con 300 µL de BSA 1% en PBS a 37°C durante 1 hora, o a temperatura ambiente durante 2 horas. Las diluciones de los VHHs de detección y de los conjugados se realizaron en PBS-BSA 0,2%-Tween 0,05% (solución diluyente), y las incubaciones de los mismos se realizaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Entre cada uno de los pasos del ensayo se lavó 6-8 veces con PBS-T.

Las diluciones de TL1A se realizaron en PBS-BSA 1% en los primeros ensayos, incubándose durante 1 hora a temperatura ambiente con

agitación. Posteriormente se realizaron en suero comercial deslipidizado y libre de vitamina D (#SP1080, SERATROL™, Golden West Biologicals), y se incubaron durante 1 hora en las mismas condiciones.

Se utilizaron los conjugados estreptavidina-HRP (#85878, Sigma) a una dilución 1/5000 o el anticuerpo anti-HA-HRP (#12013819001, Roche) a una dilución 1/4000 según el caso. El sustrato de la peroxidasa utilizado por defecto en la mayoría de los ensayos fue el TMB, en caso contrario se aclara específicamente el sustrato empleado. En el caso del TMB (sección 2.1), se utilizaron 100 µL/pocillo de esta solución y se detuvo la reacción mediante el agregado de 50 µL/pocillo de H₂SO₄ 2 N. La lectura de las placas se realizó a 450nm con corrección a 600nm, empleando el equipo FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Germany).

Para los ensayos revelados con OPD o ABTS, se utilizaron 100 µL/pocillo del sustrato pero las reacciones no se detuvieron. Las lecturas se realizaron a 415 nm (ABTS) o 450 nm (OPD) con corrección a 600 nm, registrándose distintas medidas durante un período de tiempo de 30 minutos en un espectrofotómetro (Titertek Multiscan Plus, Finlandia).

2.9 Aproximación a la validación del ensayo de ELISA para TL1A generado utilizando un kit comercial

Se comparó el ensayo de ELISA generado en este trabajo con un kit comercial de ELISA para hTL1A (#900-M290, PeproTech), siguiendo las instrucciones del fabricante. El kit, que presenta un límite de detección de 62 pg/mL, incluye los anticuerpos de captura y de detección, el estándar de TL1A recombinante humano y el conjugado avidina-peroxidasa que permite el desarrollo de color durante el revelado.

Brevemente, se sensibilizaron placas de ELISA (MaxiSorp ELISA plates, #44-2404-21, Nunc) con 100 µL/pocillo del anticuerpo de captura a una concentración de 1 µg/mL en PBS a temperatura ambiente ON. Posteriormente se lavó 4 veces con PBS-T y se bloqueó con 300 µL/pocillo de BSA 1% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente.

La curva estándar del kit se realizó por triplicado en PBS-BSA 0,1%-Tween 0,05% en el rango de 4 ng/mL a 62 pg/mL de TL1A, como indica el fabricante. Además se hicieron adiciones de concentraciones conocidas de TL1A en suero comercial humano (#SP1080, SERATROL™, Golden West Biologicals) y en suero de donantes sanos. Las diluciones de TL1A se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación.

Luego se incubó con 100 µL/pocillo del anticuerpo de detección a 0,5 µg/mL durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación, y por último se incubó con una dilución 1/2000 de avidina-peroxidasa durante 30

minutos a temperatura ambiente con agitación. Las diluciones del anticuerpo de detección y de la avidina-peroxidasa se realizaron en PBS-BSA 0,1%-Tween 0,05%, y luego de cada incubación la placa se lavó 4 veces con PBS-T. Por último se reveló con la solución de ABTS descrita anteriormente (sección 2.1), y se siguió el desarrollo de color midiéndose la absorbancia a 415 nm con corrección a 600 nm, cada 5 minutos durante 30 minutos en un espectrofotómetro (Titertek Multiscan Plus, Finlandia).

2.10 Tratamiento de datos

Para el cálculo de promedios, desviaciones estándar u otras operaciones se empleó el programa Excel (Microsoft Office) versión 2007. Para realizar ajustes lineales o sigmoides se empleó el programa informático Origin 8.6.

Gran parte de las muestras fueron analizadas por duplicado o triplicado. Los límites de detección de las curvas obtenidas se calcularon según el método de determinación de blanco (Shrivastava and Gupta, 2011), en donde el límite de detección se establece como la concentración de analito correspondiente al valor del blanco del ensayo (o *background*) más 3 desviaciones estándar del mismo.

3 RESULTADOS

De acuerdo con el objetivo planteado para este trabajo, se comenzó con la selección de anticuerpos VHHs con especificidad por TL1A a partir de una biblioteca de anticuerpos de cadena pesada de llama expresada en fagos filamentosos, obtenida de un animal previamente inmunizado con la proteína de interés (Materiales y Métodos, sección 2.3). Previo al comienzo de esta tesina, ya se había realizado la titulación de los anticuerpos totales contra TL1A en suero de la llama mediante ELISA, los cuales indicaban una buena respuesta de anticuerpos contra dicha proteína (resultados no mostrados).

3.1 Selección de VHHs específicos por TL1A

Se realizaron rondas de selección consecutivas con el fin de aumentar el porcentaje de VHHs específicos para TL1A (como se explica en la sección 2.4 de materiales y métodos). En la primera ronda de selección (ronda 1), se incubó la biblioteca previamente generada en el grupo de investigación (título de $1,14 \times 10^{12}$ pfu/mL) en pocillos de ELISA preadsorbidos con 10 µg/mL de TL1A. Tras los lavados y la elución con tripsina, se recuperó una fracción de fagos a la que denominamos *output*, con un título de $3,4 \times 10^7$ pfu/mL. Luego de su amplificación (ver materiales y métodos) el título obtenido fue de $2,7 \times 10^{12}$ pfu/mL (*output* amplificado).

La segunda ronda de *panning* (ronda 2A) se llevó a cabo de igual forma que la primera, obteniéndose un *output* de $3,5 \times 10^9$ pfu/mL. Al comparar el título de ambos *outputs*, luego de ser normalizados por sus correspondientes *inputs* (el título de la biblioteca amplificada para la ronda 1 y el título del primer *output* amplificado para la ronda 2A), se observa que el segundo es dos órdenes de magnitud mayor que el primero, lo que sugiere que se logró un importante enriquecimiento en VHHs específicos para TL1A tras estas dos rondas de selección.

Para analizar si este enriquecimiento era suficiente como para aislar varios clones específicos contra TL1A, se realizó un *screening* (que consta en un ensayo de ELISA detallado en materiales y métodos, sección 2.4.3) a partir de 10 clones seleccionados aleatoriamente, obtenidos de una de las placas de LB agar utilizada para cuantificar el *output* de la ronda 2A (fig. 10).

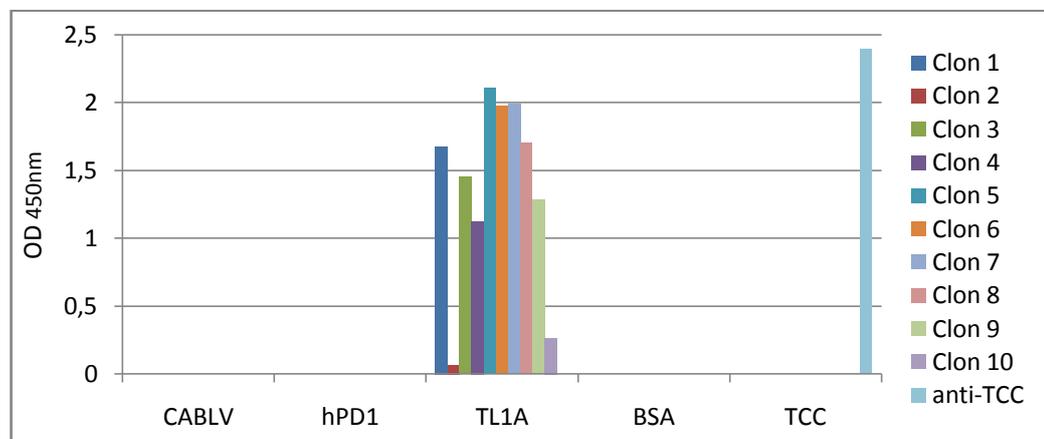


Figura 10. Screening de clones seleccionados al azar obtenidos a partir del *output* de la ronda 2A. Se muestra la reactividad de los clones frente a las 3 proteínas

utilizadas simultáneamente en la inmunización de la llama (CABLV, hPD1 y TL1A), y frente a la BSA y TCC-OVA (incluyéndose un clon anti-TCC como control positivo del ensayo). TCC: hapteno utilizado en el laboratorio contra el cual se han aislado VHHs previamente (Tabares-da Rosa et al., 2011).

Como muestra la figura 10, todos los clones aislados reconocieron a TL1A y mostraron una buena especificidad contra dicha proteína ya que no reconocieron el resto de las ensayadas.

Una vez seguros de haber aislado clones específicos para TL1A, se decidió realizar una nueva ronda de selección a partir del *output* amplificado de la ronda 1, utilizando condiciones más exigentes de manera de conseguir clones con mayor afinidad por TL1A, descartando aquellos que reconocieran con moderada o baja afinidad a dicha proteína. Para ello, una de las estrategias más utilizadas en *phage display* es disminuir la concentración de sensibilización con el antígeno de forma de establecer una competencia entre fagos específicos, y lograr que se mantengan unidos al antígeno aquellos más afines al mismo. Se utilizó una concentración de sensibilización de 0,5 µg/mL de TL1A para esta ronda de selección (ronda 2B). Además se realizaron lavados exhaustivos y por tiempo prolongado con PBS-Tween 0,05% de los pocillos tras la incubación con el *input*, de forma de aumentar la competencia entre clones por la unión a TL1A. También se realizó otra ronda de selección (ronda 2C) en donde se mantuvo la misma concentración de *coating* de la ronda 1 (10 µg/mL de TL1A), pero se realizaron los mismos lavados

exhaustivos que en la ronda 2B, de manera de tener una condición intermedia de exigencia.

Se cuantificaron los *outputs* sin amplificar obtenidos a partir de estas rondas de *panning*, siendo de $3,5 \times 10^6$ pfu/mL para la condición de *coating* de 0,5 µg/mL (ronda 2B) y de $1,0 \times 10^8$ pfu/mL para la condición de 10 µg/mL (ronda 2C).

Nuevamente se realizó un *screening* a partir de 10 clones seleccionados al azar del *output* de cada una de las rondas, para evaluar la especificidad de los mismos. Como puede observarse en la figura 11, todos los clones seleccionados reconocieron TL1A pero no las otras 2 proteínas que se utilizaron en la inmunización, lo cual indica que a partir del *panning* realizado se obtuvieron clones específicos por TL1A.

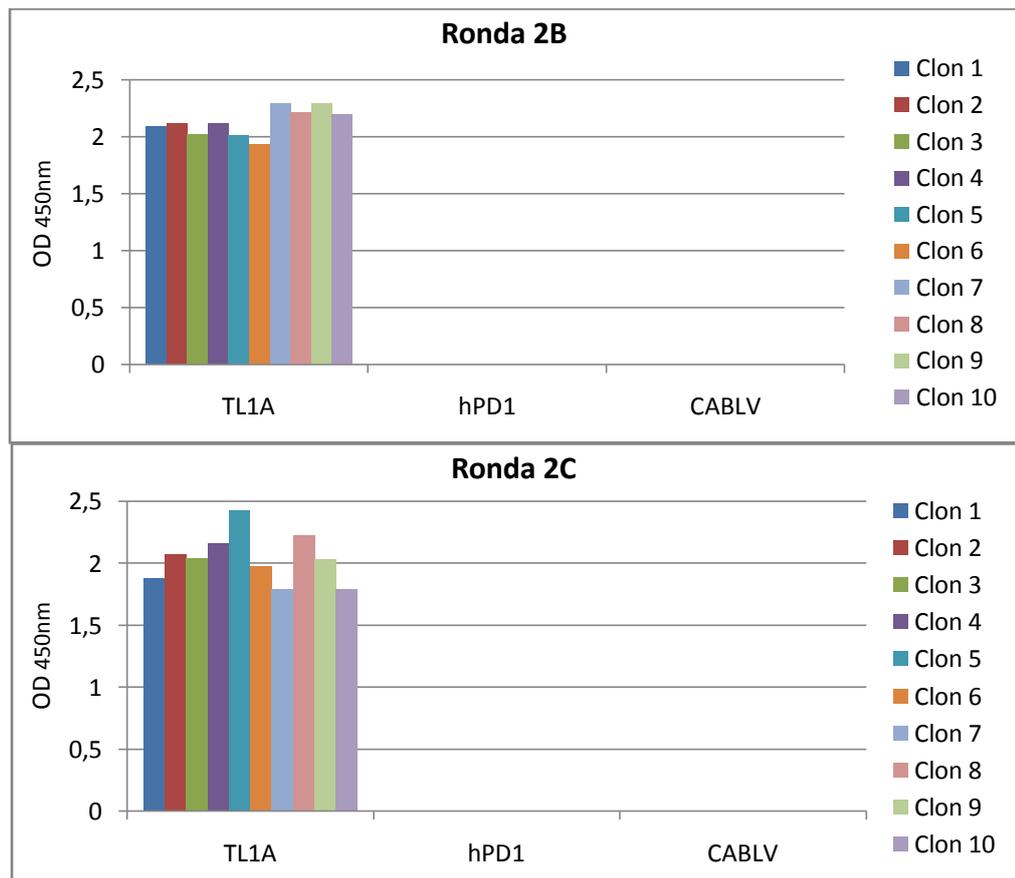


Figura 11. Screening de clones seleccionados al azar obtenidos a partir del segundo output en condiciones exigentes (rondas 2B y 2C). Se observa la reactividad de los clones de VHHs frente a las 3 proteínas utilizadas simultáneamente en la inmunización de la llama (hTL1A, hPD1 y CABLV).

Sin embargo, estos resultados no dan información acerca de la afinidad de los clones aislados mediante esta estrategia de selección, por lo que se procedió a realizar un ensayo para identificar aquellos VHHs con mayor afinidad (que se explicará en la sección 3.3), que serán los elegidos para desarrollar el ELISA para TL1A. Para realizar este ensayo (denominado “ranking de afinidades”) fue necesario realizar diferentes

clonajes de los *outputs* obtenidos en las rondas de *panning* a vectores de expresión propicios para poder capturar y/o detectar los VHHs.

3.2 Clonaje de VHHs anti-TL1A a vectores de expresión procariotas

Inicialmente, y ya que en el laboratorio existían indicios de la desnaturalización de los VHHs al ser adsorbidos en la placa de ELISA directamente, se eligió un formato de ELISA en el cual el VHH de captura se uniera a otra proteína de *coating*, que lo expusiera en su estructura nativa al posterior encuentro con el analito. Para eso se eligió como proteína de *coating* a la avidina, y se utilizó el VHH de captura biotinilado para poder unirse a la misma. Tras la incubación con TL1A, se utiliza un VHH de detección fusionado a un epítotope inexistente en el VHH de captura (en este caso se eligió el epítotope HA), de manera de utilizar un anticuerpo anti-HA-HRP que reconociera únicamente al VHH de detección, permitiendo el desarrollo de señal en el revelado.

Con este formato de ELISA en mente, se prosiguió a clonar el *output* de la ronda 2B a los vectores de expresión pINQ-BtH6 y pINQ-OmpA (ver cassettes de expresión en sección 2.5 de Materiales y Métodos).

El primero permite la expresión del VHH con una secuencia de biotinilación de 15 aas en su Ct seguida de una cola de 6 histidinas, que puede ser usada para la purificación de la proteína recombinante por cromatografía de afinidad, o para su detección en ELISA mediante un

anticuerpo anti-His-HRP. Además el vector incluye una secuencia de localización periplasmática para la proteína recombinante. Para que ocurra la biotinylación *in vivo* de los VHHs, el vector pINQ-BtH6 debe ser co-transformado con otro vector (BirA) que codifica para la enzima biotinylase de forma inducible en respuesta a arabinosa, como se explica en la sección 2.5.2 de Materiales y Métodos. Esta enzima es la responsable de la biotinylación de proteínas con el *tag* de biotinylación adecuado cuando hay biotina presente en el medio. De esta forma se generan VHHs biotinylados en su Ct (una biotina por VHH), que se puede unir a la avidina que se utiliza como proteína de *coating* en el primer ensayo de ELISA propuesto.

El vector pINQ-OmpA genera la expresión del VHH asociado a un epítipo HA en su extremo Ct, seguido de una cola de 6 histidinas para su purificación y/o detección (según el formato de ELISA que se elija esta cola será necesaria o no para la detección del VHH). Este vector también incluye una señal de localización periplasmática. Expresando los VHHs a partir de este vector se obtendrán, entonces, dichos *nanobodies* unidos a un epítipo HA que permite su utilización como anticuerpos de detección, al utilizar posteriormente un anticuerpo secundario anti-HA-HRP.

Como se explica en la sección 2.5.3 de Materiales y Métodos, tanto los insertos (VHHs) como los vectores fueron digeridos con la enzima SfiI, obteniéndose fragmentos de 400 y 5500 pb respectivamente (fig. 12). Tras la digestión, los genes de los VHHs se ligaron con los

correspondientes vectores. Los productos de ligación se utilizaron para transformar células electrocompetentes *E. coli* (cepa BL21-DE3 para el vector pINQ-OmpA y BL21-pBlr para el vector pINQ-BtH6), y las colonias aisladas obtenidas luego de plaquear alícuotas de las células transformadas se utilizaron para los *screenings* (secciones 3.3 y 3.6).

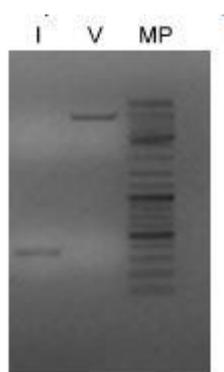


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa para los productos de digestión de los VHHs (I) y el vector pINQ-OmpA (V) con la enzima Sfil.

3.3 Ensayo de ranking de afinidades

Luego de los clonajes, se prosiguió a identificar los clones con mayor afinidad por TL1A. Para ello se empleó una estrategia desarrollada en el laboratorio, que consiste en un ELISA de captura para el analito conjugado a la peroxidasa. Se utiliza avidina como proteína de *coating* para evitar la desnaturalización del VHH, el cual se encuentra en su forma biotinilada para poder unirse a la misma (es decir, expresado a partir del vector pINQ-BtH6). Tras la incubación con diferentes VHHs biotinilados, se incuban los pocillos con TL1A-PO, y se revela el ensayo.

El paso crucial en este ensayo consiste en la saturación de los sitios de unión entre la avidina y el VHH-biot, para lo cual es necesario agregar VHH-biot en exceso al pocillo sensibilizado con avidina (por esta razón es importante que los VHHs biotinilados se produzcan en alta concentración de forma soluble). Con dicha saturación se logra obtener la misma cantidad de VHH-biot en cada pocillo tras los lavados. Por lo tanto, tras la incubación de los VHHs con una dilución adecuada de TL1A conjugado a la peroxidasa (TL1A-PO) y el revelado, las absorbancias obtenidas reflejarán las afinidades de los distintos clones por la proteína (a igual cantidad de VHH y de TL1A en el pocillo, aquellos VHHs que unan más TL1A serán los más afines por éste).

Para este ensayo se seleccionaron 94 colonias al azar de una placa de LB agar que contenía diferentes VHHs clonados en el vector pINQ-BtH6, y los VHHs-biot se produjeron en 4 bloques réplica de cultivo celular con 500 μ L/pocillo (2 mL de cultivo total por cada clon). En el proceso de producción se dejaron 2 pocillos sin inocular para controlar el crecimiento libre de contaminaciones y como controles negativos del ensayo de ELISA (Materiales y Métodos, sección 2.6.2). Posteriormente los sobrenadantes de los 4 bloques se purificaron por columnas de Ni-NTA.

En primera instancia, para corroborar la saturación de los pocillos sensibilizados con avidina con los diferentes VHHs-biot producidos, se realizó un ELISA en el cual se sensibilizó la placa con una cantidad de avidina de 0,1 μ g/pocillo. Tras el bloqueo, la placa se incubó con

diluciones al medio de los VHHs-biot purificados. Posteriormente se realizaron los lavados con PBS-T y se incubó con anti-His-HRP para el revelado (se recuerda que los VHHs-biot cuentan con una cola de 6xHis para su purificación y/o detección). Si efectivamente se logró la saturación de los sitios de avidina con los VHHs-biot, la señal de absorbancia debería ser igual para todos los pocillos (excluyendo a los controles negativos) y mayor a 1,5 UA (según experiencia anterior en el laboratorio).

Sin embargo los valores de absorbancia obtenidos fueron muy variables y no se observó la saturación esperada en todos los casos (fig. 13). Dichos valores se encuentran en el intervalo de 0,12-2,14 UA. Consideramos saturados a los pocillos con una absorbancia mayor a 1,5 UA, los cuales corresponden solamente a un 44% de los clones producidos.

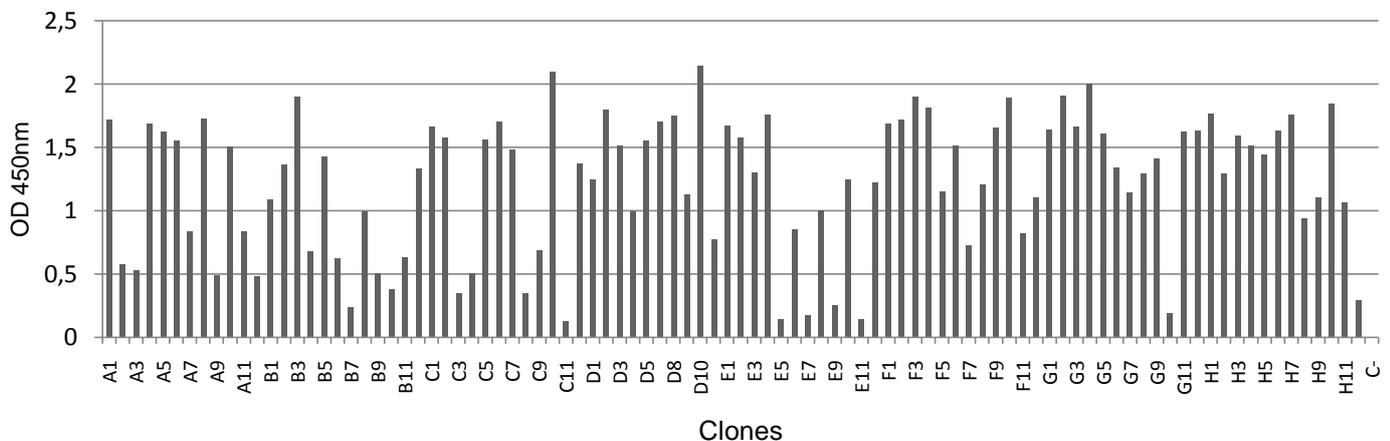


Figura 13. Prueba de saturación de los VHH-biot producidos. Se muestra el resultado para los 94 clones producidos y para un control negativo sin VHH (C-).

Según los resultados obtenidos, y la previa experiencia del grupo de investigación, se calculó que para obtener la completa saturación de la placa se debía producir cada clon en un volumen de cultivo de al menos 4 veces el que se había utilizado. Dado que se trata de 96 clones, para conseguir esta producción se deberían utilizar 16 bloques de cultivo, y luego purificar el volumen total (8 mL/clon) en columnas de Ni-NTA, lo que haría el trabajo aún más arduo.

Por estas razones, y a pesar de no haber alcanzado la condición de saturación de la placa con los VHHs-biot en la mayoría de los casos, se decidió proseguir a realizar el ensayo de ranking de afinidades como se describió anteriormente (sección 2.7 de Materiales y Métodos).

Para ello, en primer lugar se conjugó TL1A a la enzima peroxidasa de rábano (HRP o PO) según el protocolo descrito en la sección 2.7.2 de Materiales y Métodos.

Posteriormente se determinó la dilución de trabajo de TL1A-PO mediante su titulación. El objetivo de esta titulación es elegir una dilución de TL1A-PO que permitiera discriminar las absorbancias de clones con diferente afinidad por TL1A (en nuestro caso particular, las diferencias en absorbancia también se atribuirán a las diferentes cantidades de VHH capturado por la avidina).

Para ello, se tomó en cuenta resultados de trabajos previos de nuestro grupo de investigación, en los cuales se demuestra que una gran

proporción de los VHHs obtenidos tras exigentes rondas de *panning* tienen afinidades similares, y solamente unos pocos se apartan de ese “rango medio”. El título de TL1A-PO que se utilice condicionará la discriminación de esos pocos clones que se aparten hacia afinidades superiores, que son los que nos interesan.

Asumiendo que nuestros clones se comportarán de igual forma, si se seleccionan algunos al azar, existe una alta probabilidad de que la mayoría tengan afinidades que caigan dentro del denominado “rango medio”.

Por esta razón se produjeron 6 clones elegidos al azar (10 mL de cultivo por clon), y se corroboró la saturación de los pocillos sensibilizados con igual cantidad de avidina que el ensayo explicado anteriormente. En este caso se consiguió la saturación de todos los clones al utilizar la misma dilución que en el ensayo anterior (resultados no mostrados).

La titulación de TL1A-PO se realizó en una placa sensibilizada con avidina a 1 $\mu\text{g/mL}$, la cual se incubó posteriormente con diluciones saturantes de los 6 diferentes clones, y luego con TL1A-PO partiendo de una dilución 1/3200 y realizando diluciones seriadas al medio. Para realizar el ranking de afinidades se eligió la dilución de TL1A-PO a la cual se obtuvo una absorbancia similar a 1. En todos los casos se obtuvo ese valor de DO a una dilución de TL1A-PO de alrededor de 1/200.000 (fig. 14). Utilizar dicha dilución de TL1A-PO en el ensayo de ranking de

afinidades permitirá observar diferencias de afinidad entre los clones. Aquellos que presenten una DO mayor a 1 serán más afines (la absorbancia podrá llegar hasta 3 en los de mayor afinidad) y aquellos que presenten una DO menor a 1 serán menos afines (la absorbancia podrá llegar hasta 0 en los de menor afinidad). Es necesario destacar que esta relación directa entre absorbancia y afinidad son útiles solamente cuando los pocillos se encuentran saturados por el anticuerpo biotinilado, lo cual no es nuestro caso.

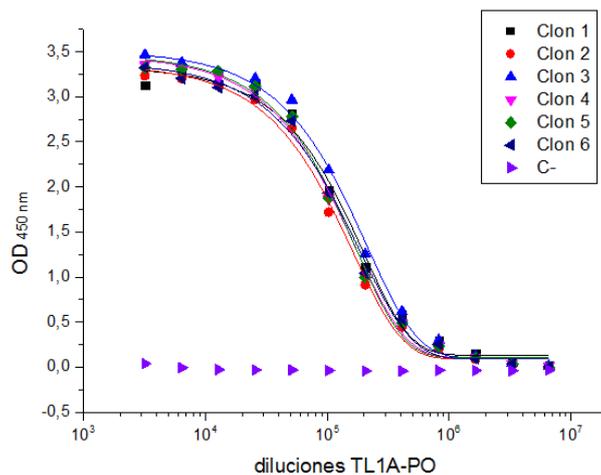


Figura 14. Curvas de titulación de TL1A-PO utilizando los sobrenadantes de 6 clones elegidos al azar. Se incluyó un control negativo: C- (VHH biotinilado con especificidad por TCC producido en condiciones análogas y utilizado en una dilución 1/500).

Para el ensayo de afinidades se utilizó una placa pre-adsorbida con avidina a 1 µg/mL, y se incubó con los 94 clones purificados diluidos al medio y los controles negativos sin VHH. Posteriormente se incubó con

TL1A-PO a una dilución 1/200.000, y se reveló con el sustrato de la peroxidasa (TMB/H₂O₂). Al no haberse obtenido saturación para todos los clones en el ensayo anterior, no es posible comparar directamente los datos obtenidos en este ensayo.

De todas formas se puede extraer información valiosa realizando un análisis más elaborado que el inicialmente propuesto. Para ello comenzamos descartando clones que no servirán para el ensayo debido a su baja producción o a su baja afinidad.

Siguiendo esta línea, se descartaron 12 clones que presentaron una saturación muy baja (OD_{450nm} menor a 0,5 UA), que constituyeron el 11% del total. Posteriormente se descartaron clones que presentaron una baja señal en el ensayo de afinidad (OD menor a 0,9 UA, lo cual correspondería a menos del 75% de la señal máxima), siendo 28 los descartados por este motivo (26% del total). Por lo tanto, 37% de los clones fueron descartados por presentar muy baja saturación o presunta baja afinidad (tabla V). Con los clones restantes, se calculó la relación entre los valores de absorbancia obtenidos en los dos ensayos (fig. 15), y se eligieron los clones con la mayor relación afinidad/saturación.

Tabla V. Valores de absorbancia obtenidos en los ensayos de saturación y de afinidad para todos los clones producidos. En rojo: controles negativos (sin VHH); en azul: clones descartados por presentar baja saturación; en verde: clones descartados por poseer presunta baja afinidad por TL1A.

Clon	Saturación	Afinidad									
A1	1,72	0,8341	C1	1,6601	1,0451	E1	1,6656	1,1277	G1	1,6401	0,9892
A2	0,5723	0,9275	C2	1,5776	0,9679	E2	1,5724	1,1253	G2	1,9072	0,7779
A3	0,5259	0,7608	C3	0,346	0,8982	E3	1,2949	0,9375	G3	1,6594	0,9065
A4	1,682	1,0066	C4	0,5041	1,0601	E4	1,7557	1,1111	G4	1,9956	0,7703
A5	1,6239	1,0024	C5	1,5603	1,235	E5	0,1409	0,7253	G5	1,6073	0,9834
A6	1,5515	0,989	C6	1,7002	0,9843	E6	0,8447	1,1721	G6	1,3407	1,1052
A7	0,8353	0,8991	C7	1,4744	1,0173	E7	0,1682	0,4999	G7	1,1433	0,7396
A8	1,7243	-0,0174	C8	0,3428	0,4921	E8	1,0003	0,9766	G8	1,2876	1,0695
A9	0,4835	0,6374	C9	0,6861	0,9345	E9	0,2542	0,6639	G9	1,4073	0,8362
A10	1,5035	0,7639	C10	2,0947	1,0523	E10	1,2428	0,7783	G10	0,1909	0,4739
A11	0,8321	0,8818	C11	0,1221	0,4267	E11	0,1456	0,5879	G11	1,6213	0,6649
A12	0,4741	0,4887	C12	1,368	1,1222	E12	1,222	0,8945	G12	1,6279	0,9295
B1	1,0885	1,1461	D1	1,2473	1,1311	F1	1,6859	0,942	H1	1,7609	0,8774
B2	1,3591	1,0202	D2	1,7907	1,0979	F2	1,7162	0,9611	H2	1,2918	1,1512
B3	1,896	1,0194	D3	1,513	1,2413	F3	1,895	0,8791	H3	1,588	1,1368
B4	0,6724	0,6168	D4	0,9917	1,0668	F4	1,8117	1,028	H4	1,5082	0,914
B5	1,4218	1,157	D5	1,5509	1,1184	F5	1,1528	1,1915	H5	1,4412	0,8768
B6	0,6234	0,7889	D6	-0,0289	0,0139	F6	1,514	0,9154	H6	1,6283	0,5245
B7	0,2367	0,5514	D7	1,7014	1,1426	F7	0,7202	0,587	H7	1,7589	0,9505
B8	0,9913	1,0448	D8	1,7502	0,8488	F8	1,2033	0,9188	H8	0,9389	0,9378
B9	0,5005	0,8098	D9	1,1282	1,0018	F9	1,6561	0,8773	H9	1,0995	0,9479
B10	0,3736	0,58	D10	2,1398	1,0326	F10	1,8883	0,9498	H10	1,8462	1,021
B11	0,6305	0,7524	D11	0,7752	0,6744	F11	0,82	0,6452	H11	1,0646	0,9071
B12	1,3325	0,9107	D12	-0,0263	-0,0169	F12	1,097	0,8804	H12	0,286	0,1506

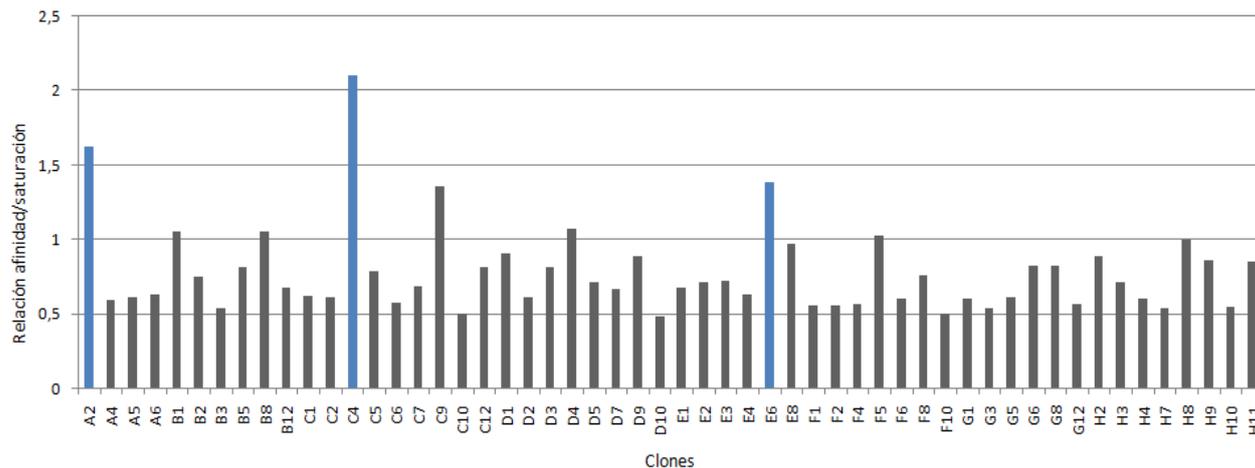


Figura 15. Relación afinidad/saturación para los clones que no fueron descartados por tener baja saturación o presunta baja afinidad. En azul se muestran los tres clones que presentaron los valores más altos de relación afinidad/saturación.

Se eligieron los tres clones con mejor relación afinidad/saturación para producirse a gran escala: A2, C4 y E6 (fig. 15), luego de comprobar por secuenciación que los mismos correspondían a clones diferentes.

Los clones producidos se purificaron por cromatografía de afinidad utilizando el equipo *ÄKTA purification system*, siguiéndose el proceso a través de medidas de absorbancia a 280 nm. En la figura 16 se muestra el cromatograma obtenido durante la purificación de A2-b, obteniéndose cromatogramas similares para los otros dos clones (resultados no mostrados).

Luego de la purificación por cromatografía de afinidad y de la diálisis de los picos de elución contra PBS 1x, se midieron las concentraciones de los VHHs producidos. Del clon A2 biotilado (A2-b) se obtuvieron 14 mg totales a una concentración de 3,8 mg/mL, mientras que de los otros dos

VHHs se obtuvieron menores cantidades: 9 mg de C4-b (6,0 mg/mL) y 4 mg de E6-b (2,7 mg/mL). De todas maneras se consiguió una buena expresión de los tres VHHs.

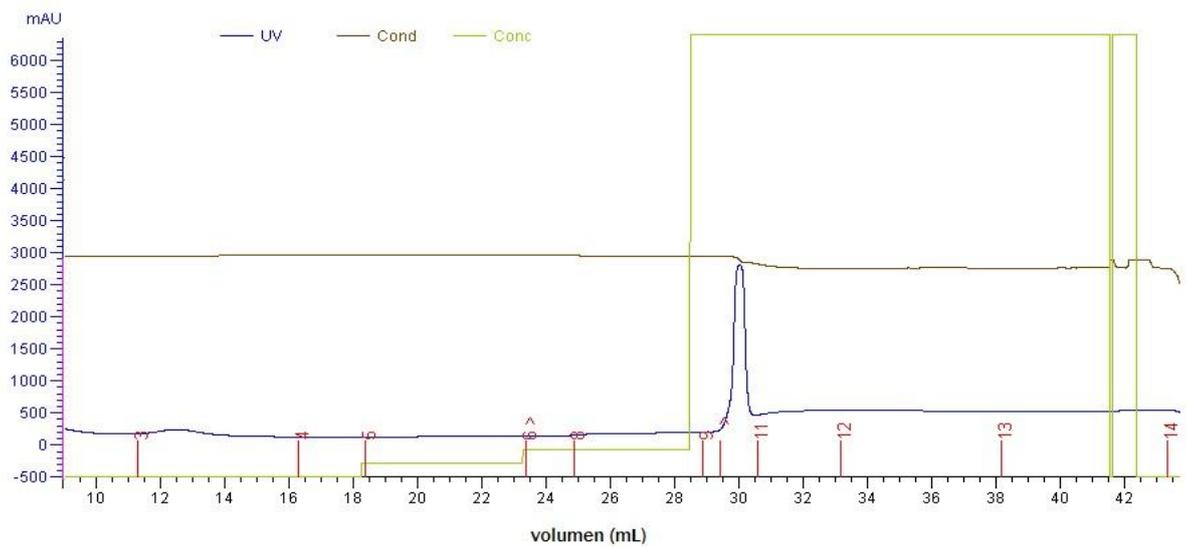


Figura 16. Cromatograma de la purificación por cromatografía de afinidad del clon A2-b. En negro se muestran los valores de conductancia, en verde el porcentaje de buffer B en buffer A (es decir, el gradiente de imidazol), y en azul la absorbancia medida a 280 nm. El pico de elución (a 100% de buffer B) aparece entre los 29 y 30,5 mL de volumen eluido aproximadamente.

El resultado de la purificación de los VHHs producidos se evaluó mediante SDS-PAGE 12%, obteniéndose para todos los casos un adecuado nivel de pureza (fig. 17).

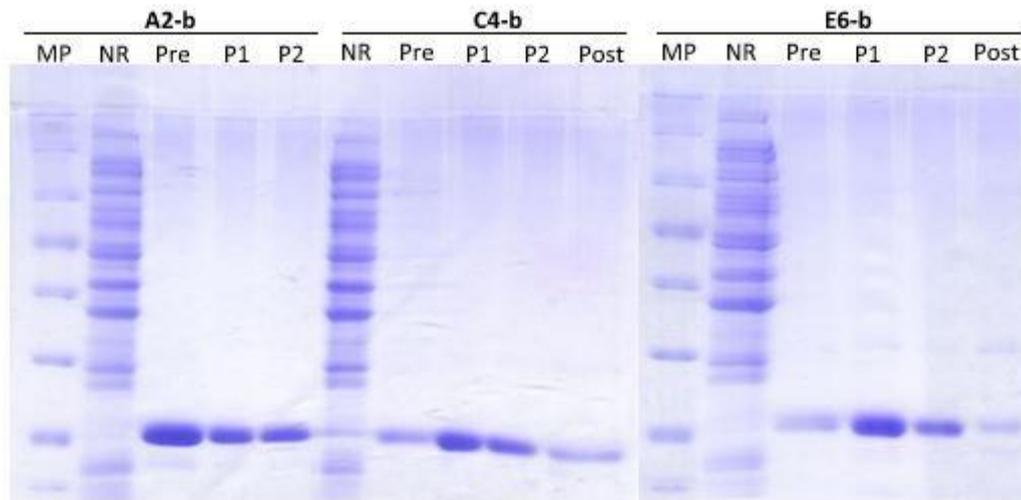


Figura 17. SDS-PAGE 12% de las fracciones de las purificaciones por cromatografía de afinidad de los tres VHHs producidos a gran escala (A2-b, C4-b y E6-b). MP: marcador de peso, NR: fracción no retenida en la columna, Pre: pico eluido con 50 mM de imidazol, P1 y P2: pico eluido con 500 mM de imidazol (se cargaron 10 μ g y 5 μ g en los respectivos carriles), Post: fracción obtenida luego del pico de elución con 500 mM de imidazol.

Por último se chequeó la especificidad de los clones producidos en una placa de ELISA sensibilizada con TL1A a 5 μ g/mL y bloqueada con PBS-BSA 1%, y se observó que todos los clones producidos mantenían su especificidad por TL1A (resultados no mostrados).

3.4 Primera aproximación a un ELISA tipo sándwich para la detección de TL1A

Una vez seleccionados algunos clones que pudieran ser utilizados como VHHs de captura del ELISA sándwich para TL1A (A2, C4 y E6), se prosiguió a realizar una primera aproximación utilizando dos anticuerpos

de detección elegidos al azar como una prueba preliminar de que la estrategia podía lograr la detección de TL1A en un rango de concentraciones de pg/mL a ng/mL. Para ello, los VHHs de detección debían estar clonados en un vector que tuviera un *tag* no presente en el vector pINQ-BtH6 del cual seleccionamos los primeros tres clones de captura. Por esta razón se utilizó el vector pINQ-OmpA, como se discutió anteriormente, que permite la expresión en la cepa BL21-DE3 de los VHHs fusionados a un epítoto HA, fácilmente detectable con un anticuerpo anti-HA-HRP. El esquema del formato de ELISA evaluado se representa en la figura 19 A.

Por lo tanto se seleccionaron 2 clones al azar (clon 1 y clon 2) clonados en el vector pINQ-OmpA y se produjeron en 30 mL cada uno. Tras comprobar la especificidad de ambos clones en pocillos sensibilizados con TL1A 5 µg/mL, se prosiguió a realizar curvas de detección de TL1A en PBS-BSA 1% usándolos como anticuerpos de detección. Para ello se utilizó una placa sensibilizada con avidina a 1 µg/mL, y se incubó con los 3 VHHs biotinilados producidos a gran escala a una concentración de 5 µg/mL. Se hicieron curvas de TL1A en el rango de 0,8-500 ng/mL, incluyéndose un punto con concentración nula de TL1A (blanco del ensayo cuya absorbancia corresponderá al *background* o señal de ruido de fondo del ensayo). Como VHHs de detección se probaron los clones 1 y 2 a una concentración estimada de 2,5 µg/mL, y se incluyó un control negativo (VHH con especificidad por TCC-OVA y con un epítoto HA).

Como puede observarse en la figura 18, los clones 1 y 2 detectaron TL1A con todos los VHHs de captura probados, a diferencia del control negativo. La detección con el clon 1 resultó en una mayor sensibilidad por el analito en comparación con el clon 2 para todos los casos.

Además, se realizó una evaluación muy preliminar de la reactividad cruzada de los ensayos con otras proteínas (utilizando las combinaciones de VHHs utilizadas en el ensayo anterior), para lo cual se utilizaron hPDL1 (del inglés: *human programmed death ligand-1*) y hPD1 (del inglés: *human programmed death receptor-1*) producidos de forma recombinante en el laboratorio, incubándose en lugar de TL1A, a concentraciones de 500 y 250 ng/mL. El ensayo no mostró reactividad cruzada con estas moléculas para ninguna de las combinaciones utilizadas (resultados no mostrados). Cabe recordar que la llama de cuyos leucocitos se obtuvo el ADNc de los VHHs para construir la biblioteca también había sido inmunizada con hPD1.

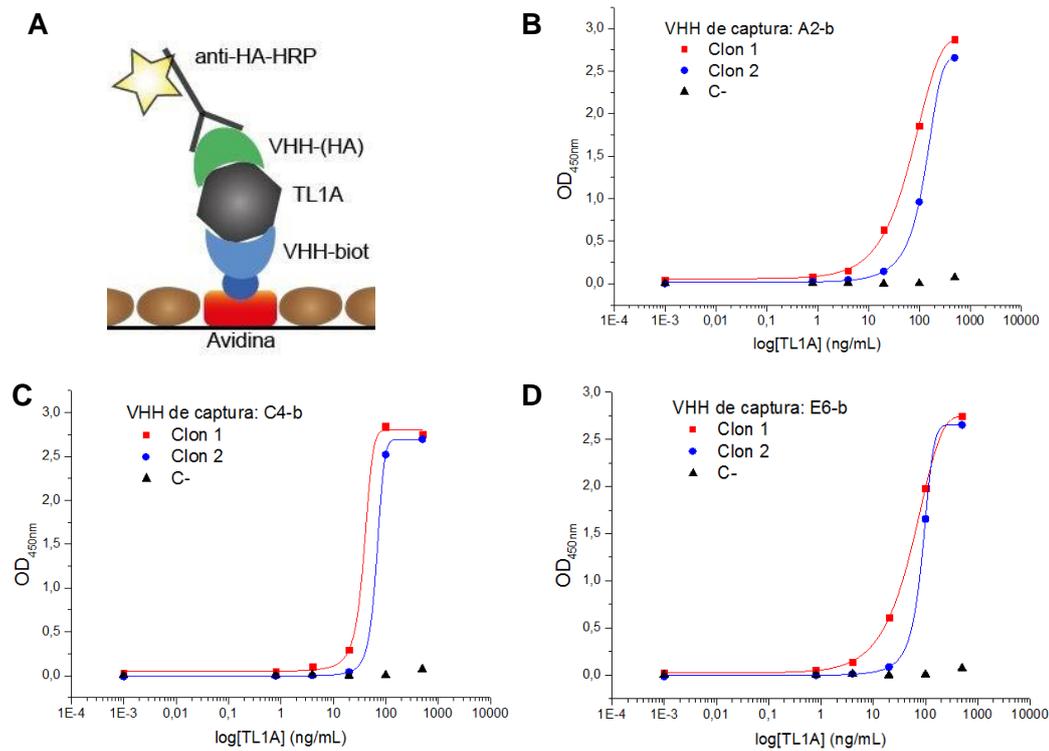


Figura 18. Primera aproximación a un ELISA tipo sándwich para TL1A. (A) Formato de ELISA ensayado. Se realizaron curvas de detección de TL1A en PBS-BSA 1%, utilizando a la avidina como proteína de *coating* (1 µg/mL) y se emplearon distintos VHHs de captura: (B) A2-b, (C) C4-b o (D) E6-b a 5 µg/mL, probando para todos los casos dos clones elegidos al azar como VHHs de detección, y un VHH anti-TCC como control negativo (C-).

Las curvas que detectaron menores concentraciones de TL1A se obtuvieron con los pares de VHHs: A2-b/Clon 1 y E6-b/Clon 1, siendo muy similares entre sí (fig. 19).

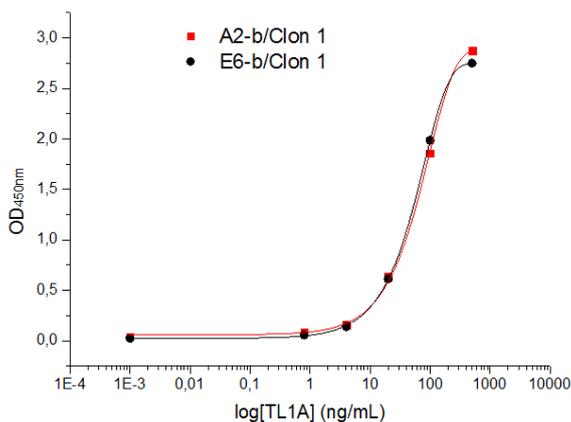


Figura 19. Curvas de detección de TL1A en PBS-BSA 1%. Se comparan las dos mejores condiciones obtenidas previamente (fig. 19).

3.5 Cambio de formato del ensayo de ELISA: estudio del efecto de la proteína de *coating*

A pesar de los antecedentes que indicaban que los VHHs son propensos a desnaturalizarse cuando se adsorben directamente a la placa de ELISA, se quiso comprobar si esto ocurría con nuestros VHHs de captura. Para ello se realizó el mismo ensayo que el descrito en la sección anterior, pero utilizando a los VHHs de captura para sensibilizar la placa, es decir evitando el paso de sensibilización con avidina (fig. 20 B). En paralelo se realizaron los ensayos de ELISA con avidina como proteína de *coating* para poder realizar comparaciones (fig. 20 A).

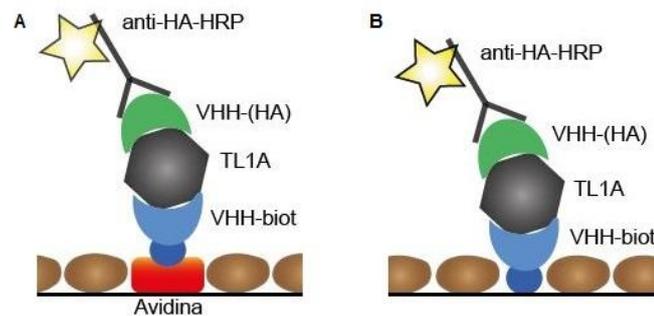


Figura 20. Diagrama esquemático de los formatos de ELISA comparados en esta sección. (A) Formato utilizado previamente, con la avidina como proteína de *coating*. **(B)** Nuevo formato probado, independiente de la avidina.

Se sensibilizaron placas con los VHHs biotinilados o con avidina, utilizando la misma concentración de cada uno (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, condición en la cual se saturan los pocillos de la placa). Posteriormente, los pocillos sensibilizados con avidina se incubaron con los VHHs biotinilados a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y luego todos los pocillos se bloquearon con BSA 1% en PBS. Se realizaron curvas de TL1A en PBS-BSA 1% en el rango de 0,2-500 ng/mL. Como VHH de detección se utilizó el clon 1 (igual concentración que ensayo anterior). Como se puede observar en la figura 21, la sensibilización con avidina no mejoró la sensibilidad del ensayo por TL1A, sino que por el contrario la empeoró notoriamente. A diferencia de los antecedentes que se tenían, estos resultados sugieren fuertemente que en este caso los VHHs de captura no se desnaturalizan al ser adsorbidos directamente a la placa.

Luego de verificar que el uso de avidina como proteína de *coating* empeoraba la sensibilidad del ensayo, se decidió cambiar el diseño

original del ELISA por aquel que en su lugar utiliza el VHH-biot directamente adsorbido sobre la placa, lo cual representa una ventaja para el ensayo disminuyendo los costos y acortando el tiempo necesario para realizarlo.

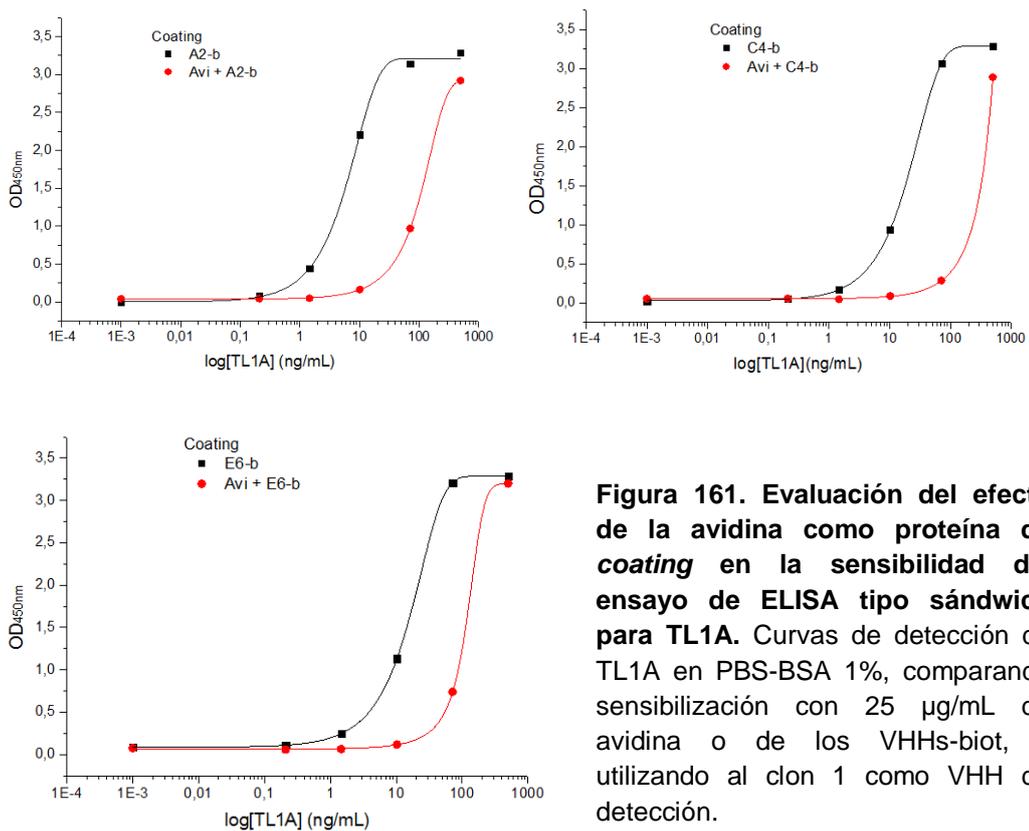


Figura 161. Evaluación del efecto de la avidina como proteína de coating en la sensibilidad del ensayo de ELISA tipo sándwich para TL1A. Curvas de detección de TL1A en PBS-BSA 1%, comparando sensibilización con 25 μ g/mL de avidina o de los VHHs-biot, y utilizando al clon 1 como VHH de detección.

3.6 Screening de potenciales VHHs de detección expresados a partir del vector pINQ-OmpA

Con el objetivo de encontrar el par de VHHs capaz de detectar la menor cantidad de TL1A posible, se prosiguió a realizar un *screening* de VHHs de detección expresados a partir del vector pINQ-OmpA.

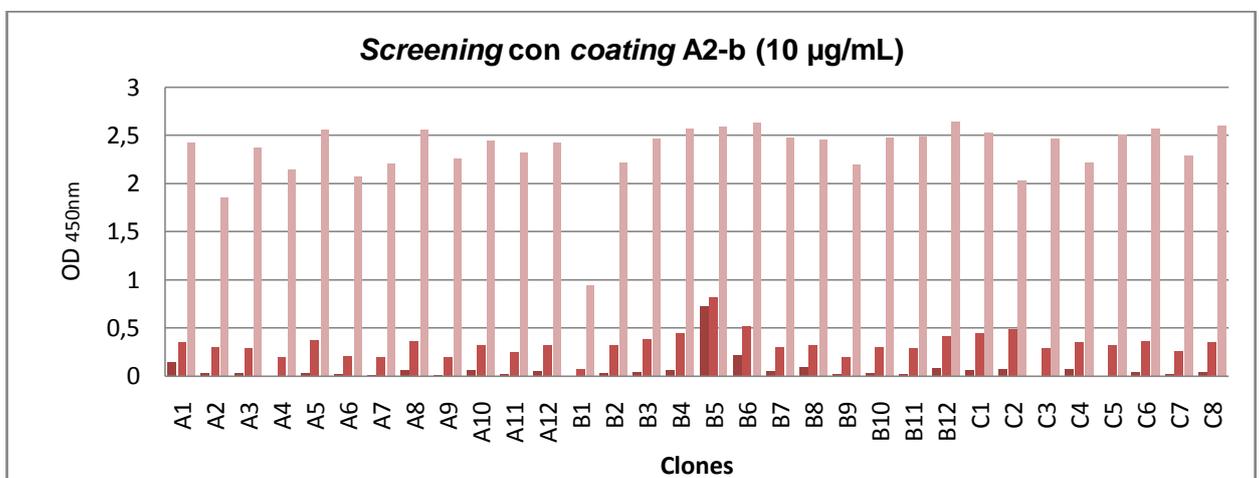
Para ello se seleccionaron 94 colonias al azar (cepa de *E. coli* BL21-DE3) de una placa de LB agar con clones en el vector pINQ-OmpA y se produjeron en un bloque de cultivo (500 mL de cultivo/clon), incluyéndose dos controles negativos sin inocular (sección 2.6.4 de Materiales y Métodos).

El ensayo de ELISA se realizó utilizando placas sensibilizadas con uno de los tres clones biotinilados elegidos como VHHs de captura, a una concentración de 10 µg/mL. Por cada VHH-biot se utilizaron tres placas, en cada una de las cuales se incubó con una concentración diferente de TL1A: 25 ng/mL, 2 ng/mL y 0 ng/mL. Luego, se incubó cada placa con los sobrenadantes de los 94 clones a una dilución 1/10, y para el revelado se utilizó la reacción del anticuerpo anti-HA-HRP con el sustrato TMB/H₂O₂.

Como se puede observar a partir de las figuras 22-24, la mayor parte de las combinaciones probadas detectaron TL1A, sin presentar reactividad contra la BSA. Esto no resulta extraño ya que el hecho de que TL1A se encuentre como trímero en su forma soluble indica que un epítipo en particular está presente al menos tres veces en la misma molécula, por lo

tanto aunque los VHHs utilizados en el ELISA reconozcan el mismo epítipo, el trímero de TL1A podrá ser reconocido tanto por el VHH de captura como por el VHH de detección, y podrá desarrollarse color durante el revelado.

Algunas combinaciones de VHHs presentaron alto *background*, por lo que fueron descartados. Cuando se utilizó C4-b en la sensibilización (fig. 23), se observó en general un mayor *background* en comparación con los otros dos clones utilizados en la sensibilización, tanto en los valores de absorbancia como en la cantidad de clones que lo presentaron. Las diferencias de señales entre el *background* y los pocillos incubados con la menor concentración de TL1A probada (2 ng/mL) fueron en general mayores cuando se sensibilizó con A2-b que cuando se utilizó E6-b (fig. 22 vs. fig. 24).



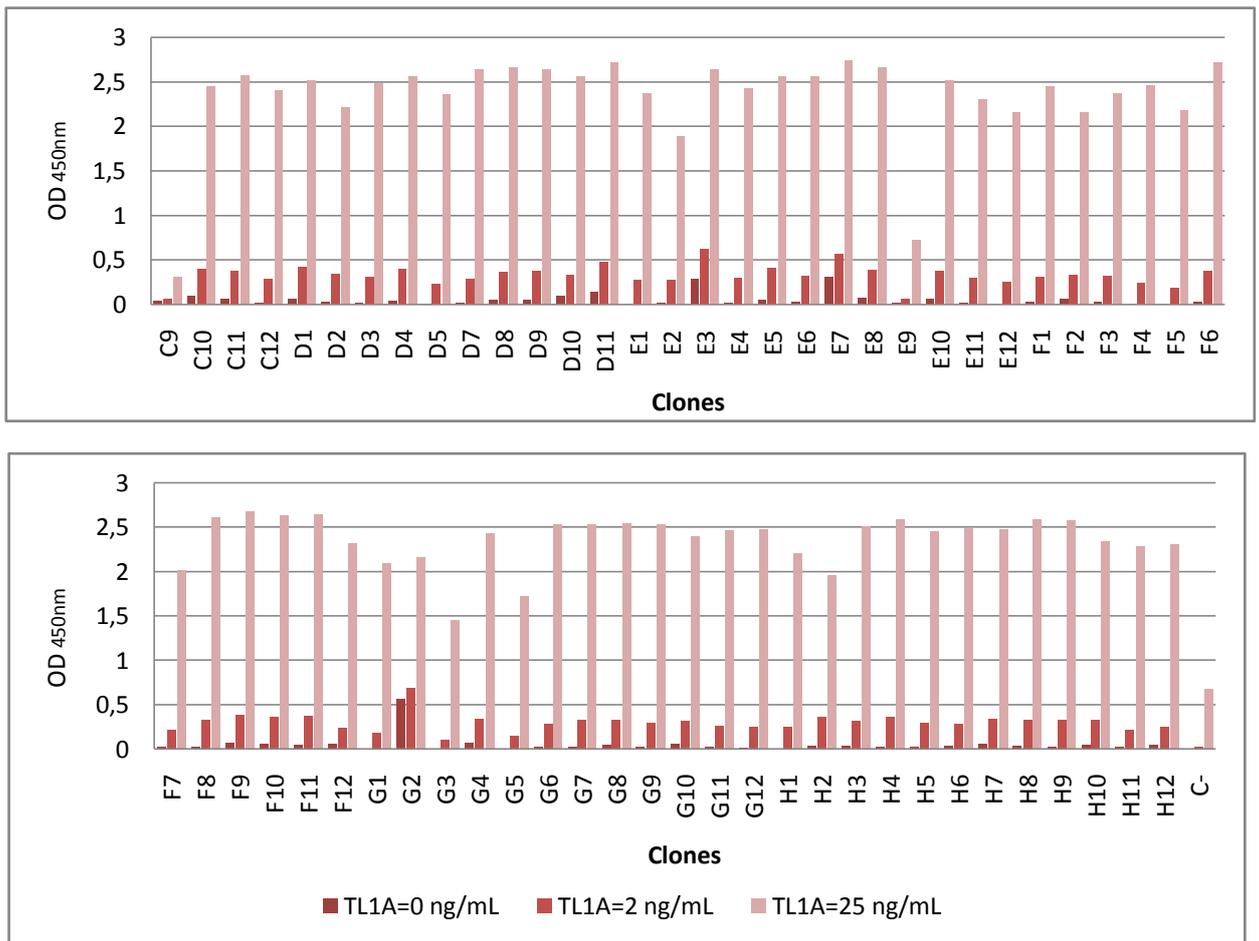
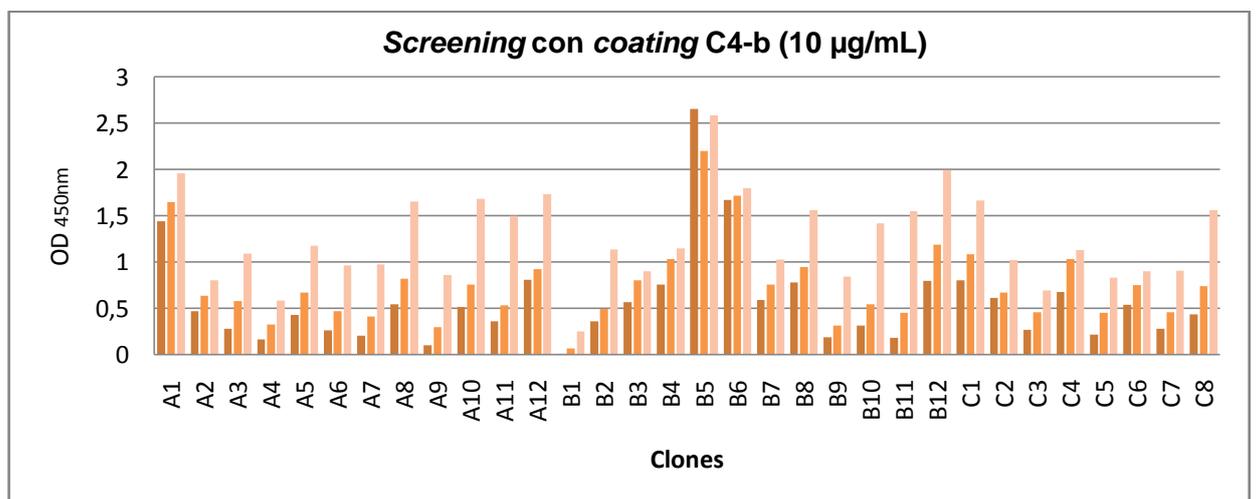


Figura 172. Screening de VHHs de detección por ELISA tipo sándwich utilizando el clon A2-b como VHH de captura. Para cada combinación se probaron 2 concentraciones de TL1A, además de evaluarse el ruido de fondo del ensayo (señal sin TL1A). C-: control negativo (sin VHH de detección).



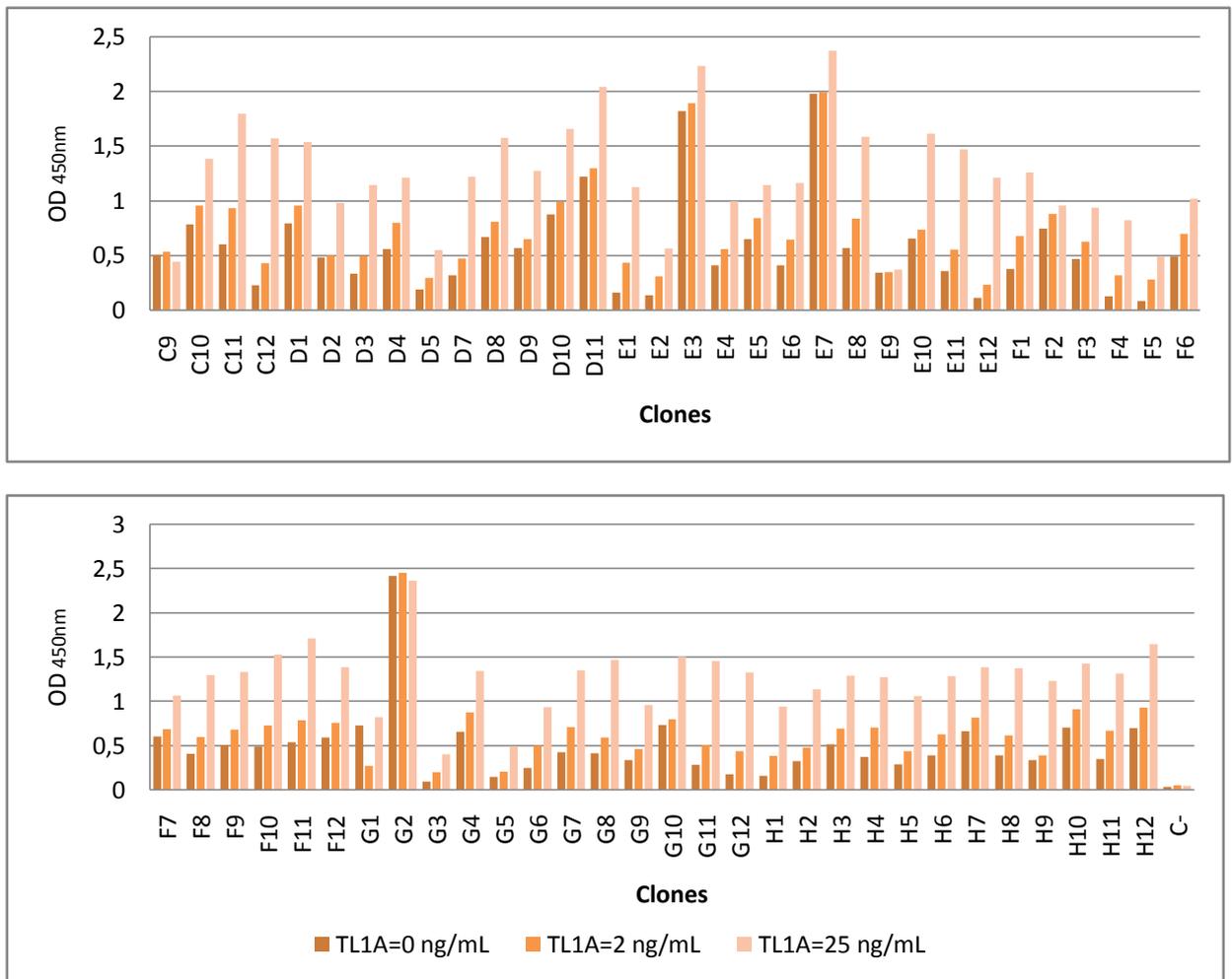


Figura 183. Screening de VHHs de detección por ELISA tipo sándwich utilizando el clon C4-b como VHH de captura. Para cada combinación se probaron 2 concentraciones de TL1A, además de evaluarse el ruido de fondo del ensayo (señal sin TL1A). C-: control negativo (sin VHH de detección).

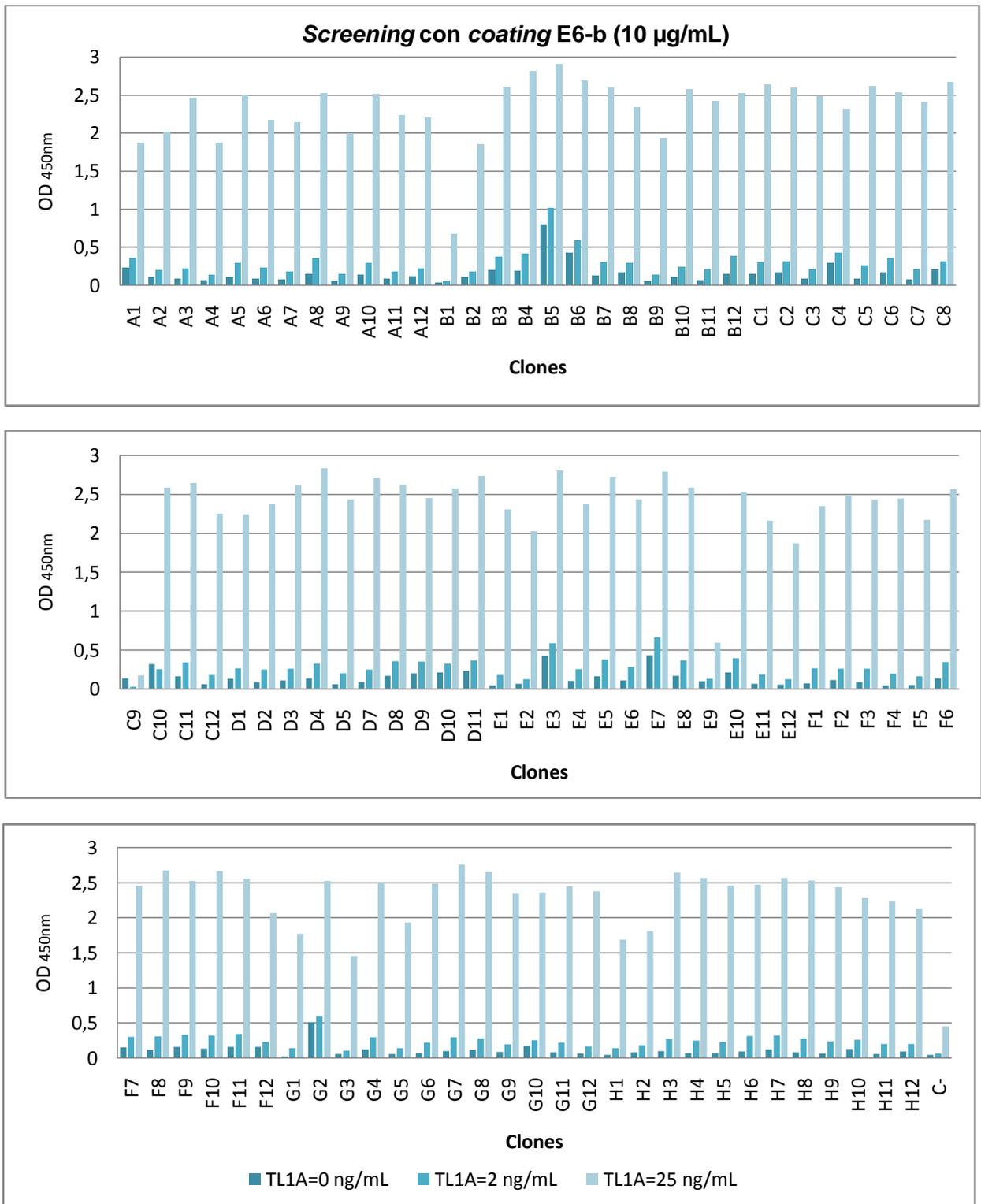


Figura 194. Screening de VHHs de detección por ELISA tipo sándwich utilizando el clon E6-b como VHH de captura. Para cada combinación se probaron 2 concentraciones de TL1A, además de evaluarse el ruido de fondo del ensayo (señal sin TL1A). C-: control negativo (sin VHH de detección).

Se analizaron los resultados obtenidos cuando se utilizó A2-b como VHH de captura, y se seleccionaron algunos clones tomando en cuenta la diferencia de absorbancias entre las condiciones de TL1A de 2 ng/mL y el *background* (fig. 25), la cual es un indicativo de la sensibilidad del ensayo. Los 6 clones con mayores diferencias en los valores de absorbancia entre ambas condiciones (C2, C1, B4, D4, E5 y D1) se utilizaron en curvas de detección de TL1A mucho más exigentes que las curvas del ELISA de aproximación.

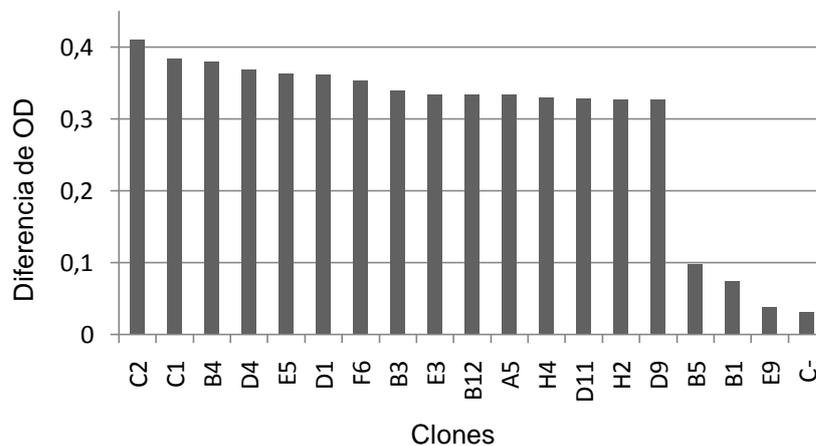


Figura 25. Diferencia de señales de absorbancia para distintos VHHs de detección entre las condiciones de TL1A de 2 ng/mL y el *background*, utilizando como *coating* al clon A2-b. Se muestran los 15 clones con mayores diferencias (C2-D9), los 3 clones con menores diferencias (B5-E9) y la diferencia correspondiente al control negativo (C-).

Las curvas de detección de TL1A se realizaron en el rango de 19,5 pg/mL a 20 ng/mL de TL1A. Se utilizaron placas sensibilizadas con A2-b a 10

$\mu\text{g/mL}$, y una dilución 1/10 de los sobrenadantes de los 6 clones seleccionados como VHHs de detección.

Las curvas obtenidas para los 6 clones seleccionados a partir del *screening* fueron muy similares entre sí (fig. 26), obteniéndose valores de *background* aceptables (menores a 0,2 UA).

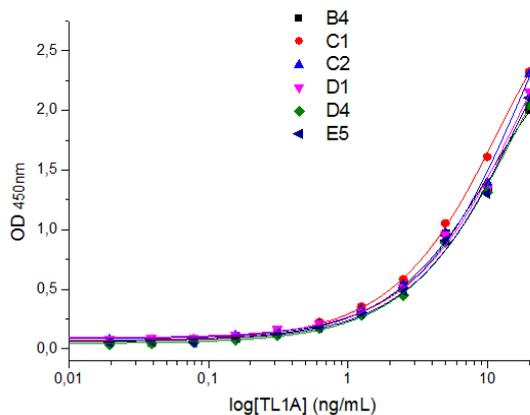


Figura 26. Curvas de detección de TL1A en PBS-BSA 1%. Coating: A2-b 10 $\mu\text{g/mL}$, VHHs de detección: sobrenadantes de los 6 clones seleccionados a partir del *screening* de clones en pINQ-OmpA cuando se utilizó a A2-b como VHH de captura.

Tras la secuenciación de los diferentes clones seleccionados como potenciales VHHs de detección, se observó que B4, C2 y E5 presentaban la misma secuencia, mientras que D1 se diferenciaba de esos tres en apenas algunos residuos en los FRs y en un residuo en el CDR2 (cambio de un aspartato por una histidina). Los otros dos clones, C1 y D4, presentan más variaciones.

En una primera instancia se seleccionaron dos de estos clones (C1 y D1) para producir a gran escala, y poder comenzar con la optimización de las condiciones del ensayo de ELISA para TL1A.

Las producciones de C1 y D1 se realizaron cada una en 500 mL de LB-kanamicina, y las purificaciones se realizaron por cromatografía de afinidad como se describe en la sección 2.6.5 de Materiales y Métodos. El cromatograma obtenido en la purificación del clon C1 se muestra en la figura 27, representativo de ambas purificaciones.

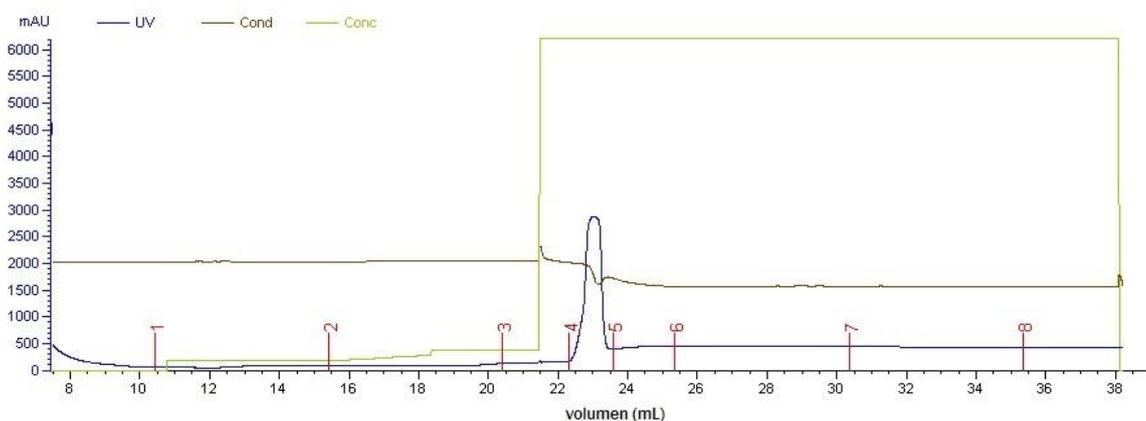


Figura 27. Cromatograma de la purificación por cromatografía de afinidad del clon C1. En negro se muestran los valores de conductancia, en verde el porcentaje de buffer B (buffer de elución) en buffer A (es decir, el gradiente de imidazol), y en azul la absorbancia a 280 nm. El pico de elución (a 100% de buffer B) aparece entre los 22 y 24 mL de volumen eluido.

Luego de la purificación, alícuotas de las distintas fracciones fueron visualizadas por SDS-PAGE con tinción con azul de Coomassie para corroborar la presencia de VHH y el nivel de pureza del mismo. En la

figura 28 se muestra el gel de poliacrilamida correspondiente a las fracciones de la purificación de C1, siendo análogo al gel de D1 (no mostrado).

Tras la diálisis de los picos de elución, se midió la concentración de los mismos por espectrofotometría a 280 nm. Se obtuvieron 4,6 mg totales de C1 y 6,3 mg totales de D1.

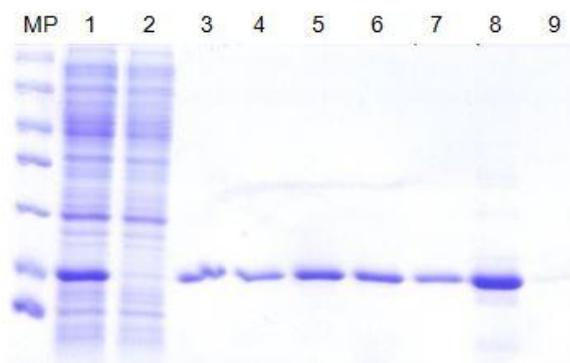


Figura 28. SDS-PAGE 12% de las fracciones de la purificación por cromatografía de afinidad del clon C1. MP: marcador de peso, 1: fracción total que se introdujo en la columna, 2: fracción no retenida en la columna, 3: fracción eluída en el lavado con buffer de lavado, 4-5: fracciones eluídas con 4% de buffer de elución (40 mM de imidazol), 6-7: fracciones eluídas con 6% de buffer de elución (50 mM de imidazol), 8: pico de elución obtenido con 100% de buffer de elución (500 mM de imidazol), 9: fracción eluída en el lavado con 100% de buffer de elución.

3.7 Optimización de las condiciones del ensayo de ELISA para TL1A en PBS-BSA

El siguiente paso consistió en la puesta a punto de las condiciones del ELISA tipo sándwich para TL1A utilizando los clones producidos a gran

escala, con el objetivo de obtener la mejor sensibilidad posible y un rango de linealidad tal que permita intrapolar valores de absorbancias correspondientes a un amplio rango de concentraciones de TL1A en las muestras.

Se probaron tres concentraciones de sensibilización con A2-b (50 µg/mL, 25 µg/mL y 10 µg/mL), y se realizaron curvas de TL1A en PBS-BSA 1%, en el rango de 78 pg/mL a 80 ng/mL. Como VHHs de detección se probaron a C1 y D1 en 3 concentraciones distintas cada uno (1 µg/mL, 3 µg/mL y 10 µg/mL), y se utilizó el anticuerpo anti-HA-HRP para el posterior revelado. A continuación se muestran los resultados correspondientes al clon C1, por ser equivalentes en gran medida a lo observado para D1. Al final de la sección se comparan ambos anticuerpos con las condiciones optimizadas.

Respecto a la concentración de VHH de detección utilizado se observa que el *background* obtenido cuando se utilizó el mismo a una concentración de 10 µg/mL aumentó notablemente para todas las condiciones de sensibilización probadas, lo cual indica que es necesario utilizar concentraciones del VHH de detección menores a esa concentración, por lo que la descartamos como potencial candidata para el ensayo (fig. 31). Por otra parte, a excepción de la condición de *coating* de 10 µg/mL, se observó un ligero aumento de sensibilidad del ensayo cuando se utilizó el VHH de detección a 3 µg/mL en lugar de a 1 µg/mL

para una condición de *coating* determinada (fig. 29), por lo cual se eligió esta concentración para el VHH de detección.

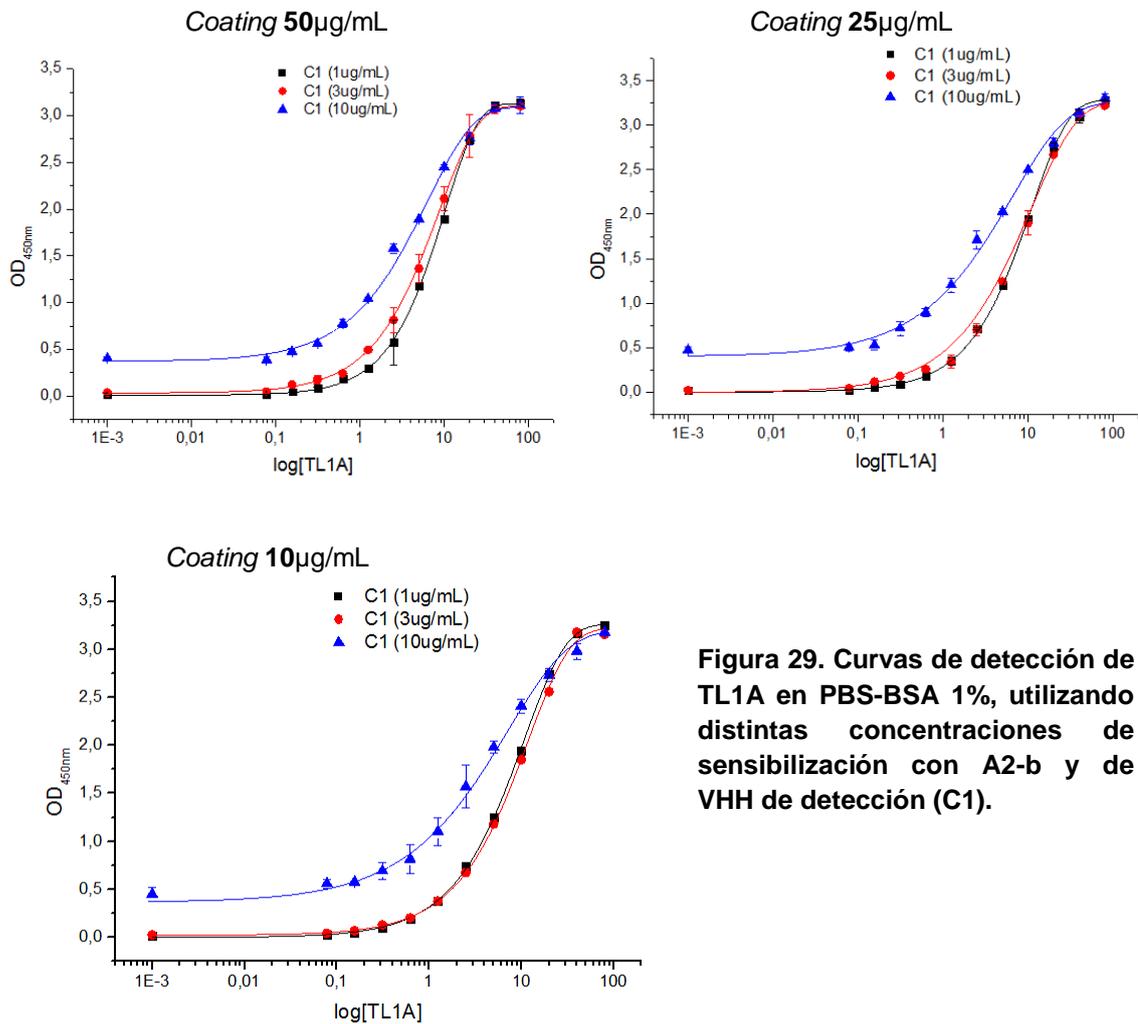


Figura 29. Curvas de detección de TL1A en PBS-BSA 1%, utilizando distintas concentraciones de sensibilización con A2-b y de VHH de detección (C1).

Con esta concentración de VHH de detección comparamos la sensibilidad del ensayo al variar la concentración de *coating* del mismo. Se observa que la sensibilidad del ensayo disminuye a una condición de *coating* de

10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (fig. 30), pero no cambia con las otras dos condiciones (25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), como se aprecia en el límite de detección de ambas curvas (aproximadamente 156 pg/mL en ambos casos).

Por lo tanto, se eligió la concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el *coating* con A2-b y de 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el VHH de detección.

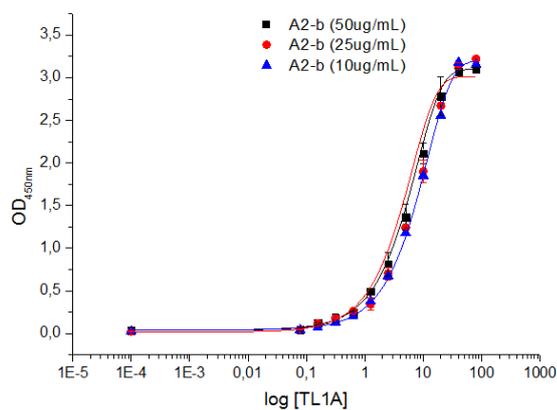


Figura 30. Curvas de TL1A obtenidas en ELISA sándwich, sensibilizando con 3 concentraciones distintas de A2-b y utilizando el VHH de detección C1 a 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Para terminar de optimizar las concentraciones de anticuerpos, se quiso probar una concentración intermedia (entre 3 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) del VHH de detección, ya que cabía la posibilidad de que con mayores concentraciones de anticuerpo de detección se pudiera aumentar la sensibilidad del ensayo sin aumentar la señal de ruido de fondo (como sucedió con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Por lo tanto se repitieron las curvas utilizando C1 a dos concentraciones: 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (fig. 31).

Para ambas condiciones el límite de detección del ensayo fue menor a 156 pg/mL. Tras este resultado alentador, se realizaron curvas más exigentes utilizando menores concentraciones de TL1A (rango de 37 pg/mL a 5 ng/mL). Se obtuvieron límites de detección muy similares en ambos casos, de aproximadamente 70 pg/mL de TL1A (resultados no mostrados). Sin embargo, se pudo observar que el *background* aumenta con la mayor concentración de C1, y por esa razón el límite de detección no mejora.

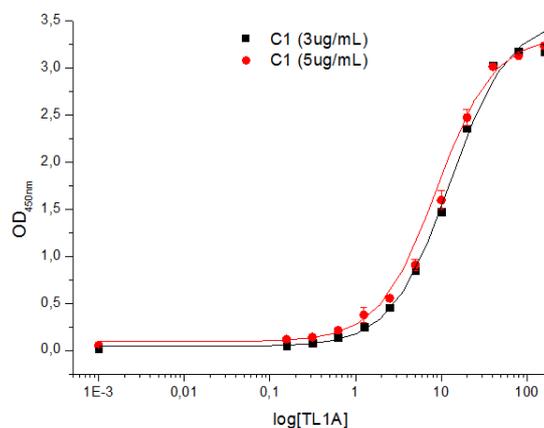


Figura 201. Curvas de detección de TL1A en ELISA sándwich utilizando A2-b a 25µg/mL en la sensibilización y C1 como VHH de detección a 2 concentraciones diferentes.

Se debe mencionar que el mismo procedimiento que el realizado para C1 se llevó a cabo con D1 para optimizar su concentración, obteniéndose el mismo resultado que para C1.

Una vez terminada la optimización de las concentraciones de anticuerpos a utilizar en el ensayo se prosiguió a realizar las curvas por triplicado en 4

experimentos diferentes, para determinar con mayor precisión el límite de detección alcanzado y el rango de linealidad a bajas concentraciones de TL1A que es el que será útil para determinar concentraciones de TL1A en muestras de suero humano.

El ensayo se realizó con TL1A diluído en PBS-BSA 1% en un rango de concentraciones de 37 pg/mL a 160 ng/mL. Los pares de VHHs utilizados fueron A2-b/C1 y A2-b/D1 (el clon a la izquierda de la barra corresponde al VHH de captura y el clon a la derecha al VHH de detección para todos los casos) a 25 µg/mL y 3 µg/mL respectivamente.

El límite de detección obtenido para el ensayo utilizando el par A2-b/C1 fue de 105 pg/mL, y con el par A2-b/D1 fue de 37 pg/mL. En ambos casos los valores de límite de detección obtenidos son comparables a los publicados para el kit comercial disponible (62 pg/mL) (fig. 32). A pesar de que el par A2-b/C1 parecería tener una mayor sensibilidad por TL1A por su menor EC50 (concentración de analito que genera una señal correspondiente al 50% del valor de la diferencia de absorbancia entre la señal máxima del ensayo y la línea de base o *background*), los valores de *background* obtenidos para este par son mayores, lo cual aumenta su límite de detección con respecto al par A2-b/D1.

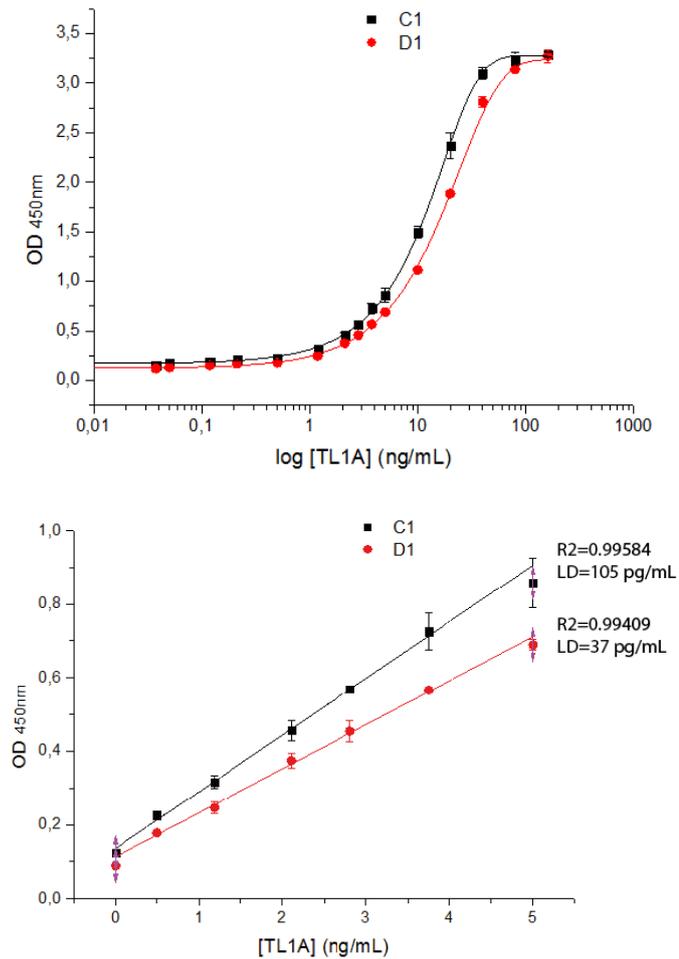


Figura 212. Curvas de detección de TL1A en PBS-BSA 1%. Coating: A2-b (25 µg/mL); VHHs de detección: C1 o D1 (3 µg/mL).

3.8 Otro formato posible de ELISA para TL1A: uso de Estreptavidina-peroxidasa para la detección

Ya que la biotilación del VHH de captura dejó de ser necesaria tras la eliminación de la sensibilización con avidina, se decidió modificar el formato de ELISA utilizado hasta el momento con el objetivo de poder utilizar a la estreptavidina-peroxidasa (S-PO) como conjugado para el

revelado. La S-PO es un reactivo de uso común en el laboratorio por lo que la utilización de la misma en lugar del anticuerpo anti-HA-HRP presenta una ventaja a la hora de la producción de un kit comercial. Además, hoy en día existen en el mercado versiones de S-PO de alta sensibilidad (*PIERCETM High Sensitivity Streptavidin-HRP, #21130*) que, por experiencias anteriores en el laboratorio, se sabe que son capaces de aumentar la sensibilidad de ensayos de ELISA diversos, por poseer varias peroxididasas concatenadas entre sí, formando un multímero que potencia la emisión de señal de forma notoria (aunque hasta el momento no ha sido posible probar esta versión de S-PO en este trabajo).

En el nuevo formato de ELISA planteado la sensibilización se realiza con un VHH sin biotinar, expresado a partir del vector pINQ-OmpA (transformado en la cepa de *E. coli* BL21-DE3), y la detección con un VHH biotinilado expresado a partir del vector pINQ-BtH6 (transformado en la cepa de *E. coli* BL21-pBIR). De esta manera el VHH de detección puede ser reconocido por la S-PO, permitiendo el desarrollo de color durante el revelado (fig. 33).

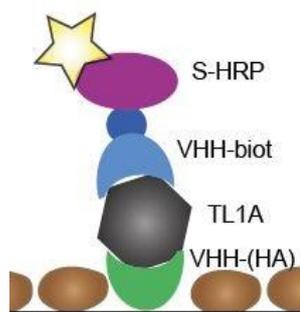


Figura 22. Diagrama esquemático del formato del ensayo de ELISA tipo sándwich basado en el uso de la S-PO.

3.8.1 Formato con anticuerpos invertidos: Como primer abordaje, se planteó la posibilidad de “dar vuelta” el par de anticuerpos con que se había puesto a punto el ensayo anteriormente descrito, de forma tal de que el anticuerpo que se usaba como VHH de detección fuese ahora usado como de captura, y viceversa. Esta estrategia era la que significaba un menor esfuerzo en términos experimentales y por esta razón fue la elegida para comenzar.

En una primera etapa se compararon ambos formatos de ELISA con las condiciones que se habían puesto a punto anteriormente, utilizando los clones A2-b, C1 y D1. Para la sensibilización los VHHs se utilizaron a 25 µg/mL y para la detección a 3 µg/mL, en su forma biotinilada (ensayo revelado con S-PO) o en su forma no biotinilada (ensayo revelado con anti-HA-PO).

Al utilizar el par C1/A2-b se vio un aumento del *background* y se obtuvo un límite de detección de 2,1 ng/mL, muy superior al registrado para el formato ELISA inverso (A2-b/C1), el cual correspondía a 105 pg/mL. La disminución de la concentración de A2-b como VHH de detección a 1 µg/mL no solucionó este problema; a pesar de que el *background* disminuyó (fig. 34), el límite de detección se mantuvo alto (2,8 ng/mL). Por lo tanto este par de VHHs presenta mayor sensibilidad por TL1A en el formato de ELISA inicialmente propuesto.

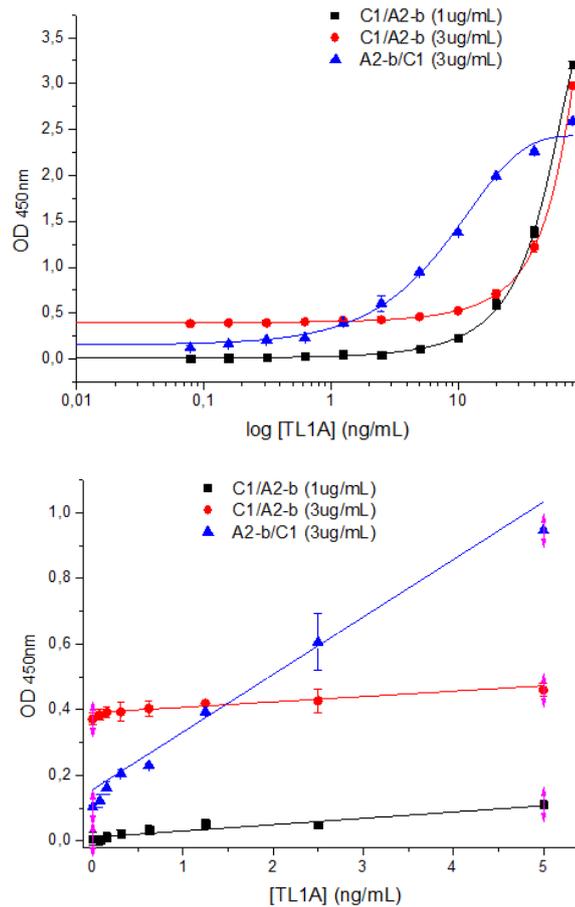


Figura 234. Curvas de TL1A comparando dos formatos de ELISA empleando los clones A2 y C1, probando dos concentraciones de A2-b como VHH de detección (1 μ g/mL y 3 μ g/mL). A la derecha se muestra el rango lineal de las curvas.

Los límites de detección obtenidos para los pares D1/A2-b y A2-b/D1 fueron de 530 μ g/mL y 37 μ g/mL respectivamente. El *background* observado cuando se utilizó A2-b como VHH de detección en estos casos no aumentó de forma notoria cuando se utilizó el mismo a una concentración de 3 μ g/mL, siendo ligeramente mayor al obtenido para el par A2-b/D1 (fig. 35).

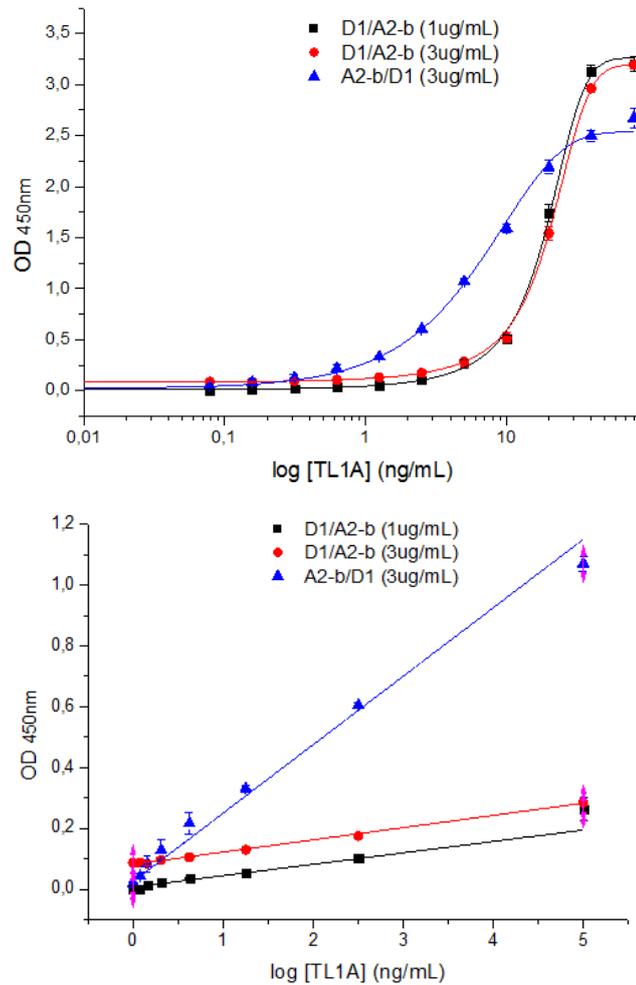


Figura 245. Curvas de TL1A comparando dos formatos de ELISA empleando los clones A2 y D1. A la derecha se muestra el rango lineal de las curvas.

Por lo tanto, para ambos pares de VHHs ensayados se obtuvieron mejores resultados cuando se utilizó al clon A2-b para la captura de TL1A como se venía haciendo desde el comienzo del trabajo.

3.8.2 Cambio de tags de los VHHs utilizados en ensayo: Ya que el primer abordaje no tuvo resultados satisfactorios se propuso expresar los VHHs de captura fusionados a un tag HA y los de detección asociados a la biotina, para seguir utilizándolos de la misma forma que en el primer ensayo propuesto, aunque con diferentes tags para detectar la presencia de TL1A mediante la S-PO. Para ello se clonó el VHH de captura A2 desde el vector pINQ-BtH6 al vector pINQ-OmpA, y los VHHs de detección que se estaban utilizando (C1 y D1) se clonaron en el sentido opuesto.

Clonaje de A2 al vector pINQ-OmpA: El clon A2, utilizado en ensayos anteriores como VHH de *coating*, fue clonado al vector pINQ-OmpA como se describe en la sección 2.5.4 de Materiales y Métodos. Luego del clonaje y de la transformación en la cepa BL21-DE3 se seleccionaron 3 colonias al azar a partir de una placa de LB-kanamicina donde se sembró una alícuota de la transformación, y se secuenció el VHH para corroborar tanto la presencia de VHH como su identidad.

Tras comprobar que el clonaje se había realizado correctamente, se llevó a cabo una producción a gran escala de A2 expresado en el vector pINQ-OmpA y se purificó por cromatografía de afinidad utilizando el equipo ÄKTA. Posteriormente, se realizó un segundo paso de purificación utilizando una resina de agarosa asociada a estreptavidina (sección 2.6.5 de Materiales y Métodos), de manera de asegurar la completa eliminación

de biotina o de proteínas traza de *E. coli* que pudieran estar biotiniladas, lo cual generaría una interferencia importante en los ensayos.

Clonaje de C1 y D1 al vector pINQ-BtH6: Se seleccionaron los clones que se consideraron mejores en el *screening* por ELISA sándwich utilizando A2-b en la sensibilización para clonarlos al vector pINQ-BtH6 y expresarlos de forma biotinilada en la cepa BL21-pBIR. Los VHHs se amplificaron por PCR a partir de minipreps realizadas de cada clon (clonados en el vector pINQ-OmpA) utilizando los primers mencionados en la tabla IV (sección 2.5.4 de Materiales y Métodos). Los productos de PCR fueron limpiados con un kit comercial y digeridos con Sfil (fig. 36), y posteriormente ligados con el vector pINQ-BtH6.

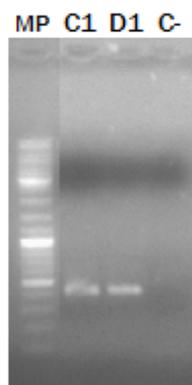


Figura 256. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de los clones seleccionados en el *screening* por ELISA tipo sándwich, digeridos con Sfil.

Los productos de ligación del vector pINQ-BtH6 y los VHHs fueron utilizados para transformar células electrocompetentes *E. coli* BL21-pBIR. Se plaquearon alícuotas de las células transformadas en placas de LB

agar-kanamicina-cloranfenicol. Posteriormente se seleccionaron 3 colonias al azar, a partir de las cuales se realizó una miniprep y se corroboró por secuenciación la identidad de los clones, obteniéndose las mismas secuencias para C1 y D1 de las cuales se había partido inicialmente.

Se hizo una producción a pequeña escala (en 10 mL de cultivo) de los clones C1 y D1 expresados en el vector pINQ-BtH6, como se explica en la sección 2.6.1 de Materiales y Métodos. Luego de 4 horas de inducción con IPTG, la fracción soluble obtenida tras el sonicado fue visualizada por SDS-PAGE (fig. 37), observándose expresión del VHH en ambos casos.

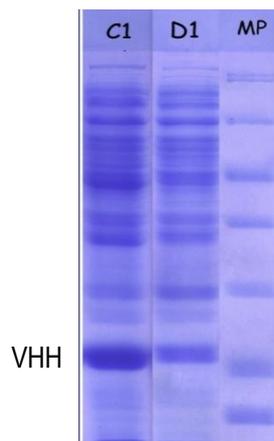


Figura 267. SDS-PAGE 12% para las fracciones solubles obtenidas durante la producción a pequeña escala de los clones C1 y D1, luego de su clonaje al vector pINQ-BtH6. Las bandas correspondientes a los VHHs se encuentran por encima de la banda de 100 kDa del marcador de peso (MP).

3.8.3 Desarrollo de ELISA sándwich para TL1A utilizando S-PO para

el revelado: Una vez realizados los clonajes necesarios y producidos los VHHs a partir de los nuevos vectores, se llevó a cabo el ensayo utilizando A2 sin biotinilar para la sensibilización y los clones biotinilados como VHHs de detección. La producción de estos clones biotinilados se realizó a pequeña escala y se purificaron por columnas de Ni-NTA, sin embargo la cantidad de VHH que se obtiene no es suficiente como para poder cuantificarla por espectrofotometría a partir del equipo *Nanodrop*, por lo tanto se ensayaron distintas diluciones de los sobrenadantes, obteniéndose los mejores resultados para una dilución 1/200 de los mismos.

Se realizaron curvas de detección de TL1A en PBS-BSA 1% en el rango de 80 ng/mL a 78 pg/mL, obteniéndose valores de *background* bajos y buenas sensibilidades de los ensayos (fig. 38), sin embargo los límites de detección no pueden ser reportados ya que no se realizaron suficientes replicados de las curvas.

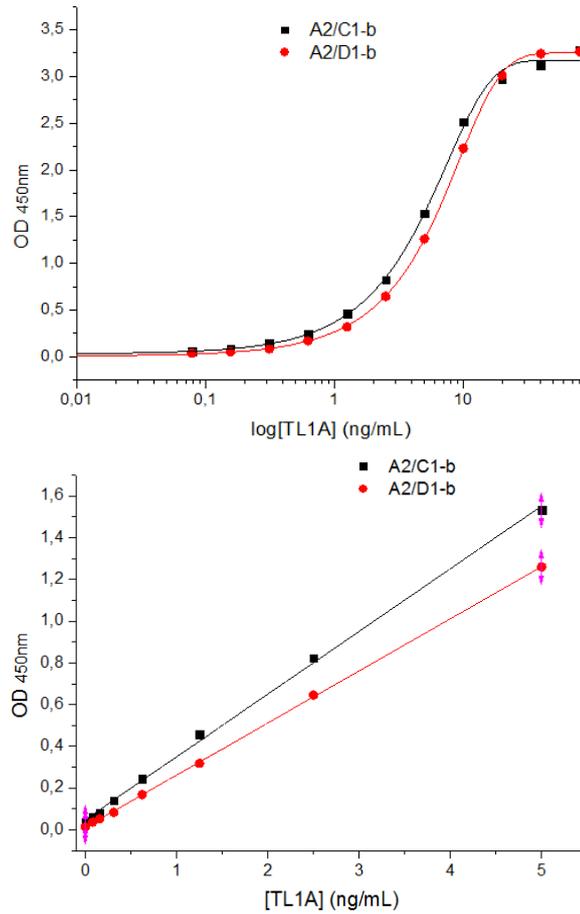


Figura 38. Curvas de detección de TL1A en PBS-BSA 1%. VHH de captura: A2 (25 $\mu\text{g/mL}$), VHH de detección: C1-b o D1-b (dilución 1/200).

Se realizó una comparación preliminar entre el formato puesto a punto anteriormente y el nuevo formato basado en el uso de la S-PO. Para ello se realizaron curvas de detección de TL1A en PBS-BSA 1% utilizando las concentraciones óptimas de los VHHs (25 $\mu\text{g/mL}$ del VHH de captura, y 3 $\mu\text{g/mL}$ del VHH de detección o una dilución 1/200 del mismo, según el caso).

Como resultado preliminar se puede decir que el nuevo formato ensayado es similar al anterior en términos de sensibilidad y de rango de cuantificación, como se puede observar en la figura 39. Los límites de detección del nuevo formato de ELISA ensayado se estimaron en 260 pg/mL para el par A2/C1-b y en 470 pg/mL para el par A2/D1-b. Sin embargo se debe tener en cuenta que las pruebas que se han hecho hasta el momento utilizando el formato basado en la S-PO son preliminares y que por lo tanto aún existe un margen de mejora para el mismo. En primer lugar se debe optimizar la concentración del VHH de detección, para lo cual éste debe ser producido a gran escala y purificado. También es necesario verificar que la concentración óptima de VHH de captura sea 25 µg/mL, como en el formato anterior. Por otra parte se podría utilizar el reactivo estreptavidina-HRP de alta sensibilidad, como se comentó previamente. Por lo tanto es posible que utilizando este formato se pueda alcanzar incluso una mayor sensibilidad de la que se obtuvo a partir del formato basado en el anticuerpo anti-HA-HRP.

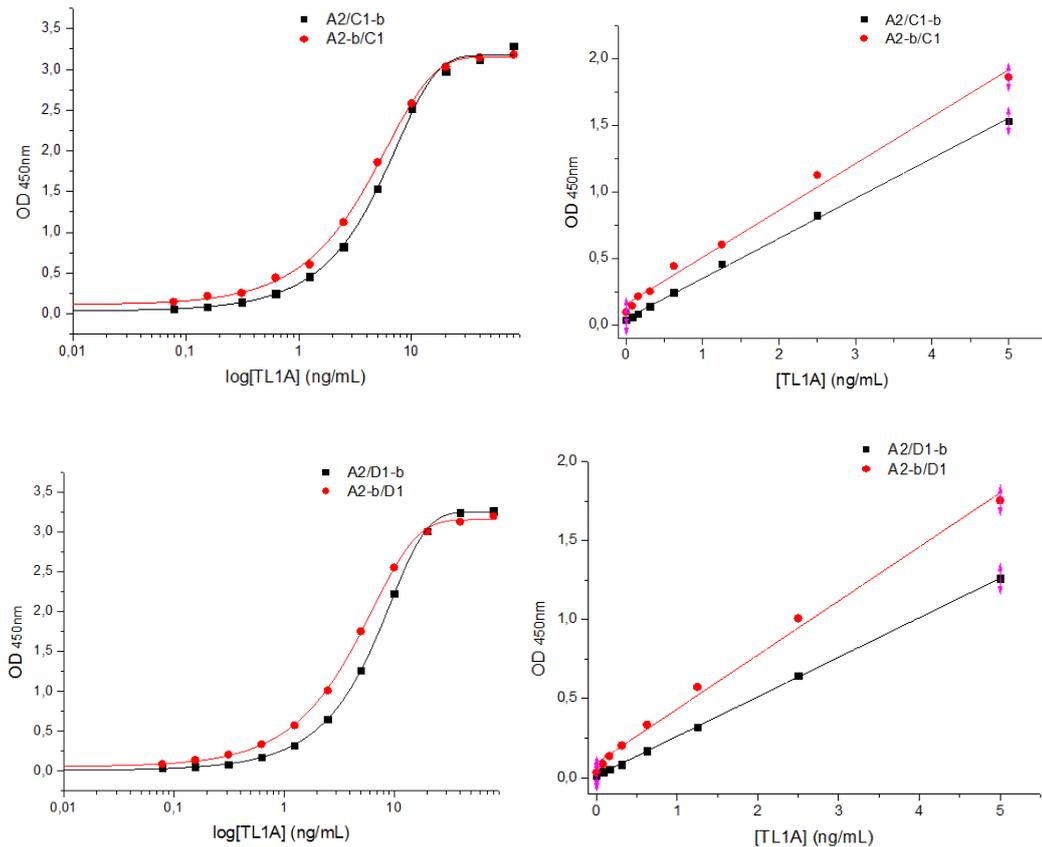


Figura 39. Comparación de los dos formatos de ELISA propuestos, utilizando el mismo par de VHHs expresados en distintos vectores. Arriba: curvas obtenidas utilizando los clones A2 y C1. Abajo: curvas obtenidas utilizando los clones A2 y D1.

3.9 Detección de TL1A en suero comercial humano a partir del ensayo de ELISA generado

Luego de haber seleccionado y optimizado las concentraciones del par de VHHs a utilizar en el ensayo (A2-b/D1), se prosiguió a evaluar la capacidad del mismo de detectar TL1A adicionado a un suero humano disponible en el mercado (al que llamaremos de aquí en más: suero comercial) obtenido a partir de individuos sanos. Para ello se realizaron

las mismas diluciones de TL1A utilizando suero comercial o PBS-BSA1% como diluyentes, con el fin de comparar las curvas de detección obtenidas para cada caso en el rango de 78 pg/mL a 80 ng/mL de TL1A.

Las curvas representativas obtenidas para ambas condiciones se observan en la figura 40. En dicha figura se observan dos situaciones diferentes en función de la concentración de TL1A. A bajas concentraciones, las señales del ensayo son mayores cuando se incubó el analito en suero comercial, lo cual indicaría que los componentes del suero interfieren en el ensayo aumentando la señal de ruido de fondo (*background*). Por otro lado, para concentraciones de TL1A mayores a 2,5 ng/mL o 5 ng/mL, las señales de la curva en suero comercial disminuyen en comparación con la curva correspondiente a PBS-BSA 1% sugiriendo que algunos componentes del suero también interfieren negativamente en la interacción de TL1A con los anticuerpos del ensayo.

Se debe tener en cuenta que aunque el suero que utilizamos pertenece a individuos sanos (a los cuales se le miden múltiples parámetros de inflamación, cayendo todos ellos en los rangos de normalidad establecidos), diferentes trabajos reportan niveles de TL1A en sueros control que superan el límite de detección de nuestro ensayo, por lo cual no es seguro que el suero utilizado no posea concentraciones bajas pero detectables de TL1A. Para medir dicha concentración se adquirió un kit de TL1A de la empresa Peprtech y se realizó el ensayo con la curva estándar del fabricante. Los resultados obtenidos, que se muestran en la

sección 3.12, no son confiables ya que no son coherentes con lo esperable como se explicará más adelante. Por estas razones asumimos que el suero comercial posee concentraciones de TL1A no detectables por nuestro kit.

Cabe destacar que el suero es una de las matrices biológicas más complejas que existen, por lo cual no es raro encontrar problemas de interferencias al intentar medir analitos en dicha matriz mediante inmunoensayos, lo que muchas veces requiere diluir bastante la muestra para la medición, o pre-tratarla para lograr disminuir el efecto “matriz”.

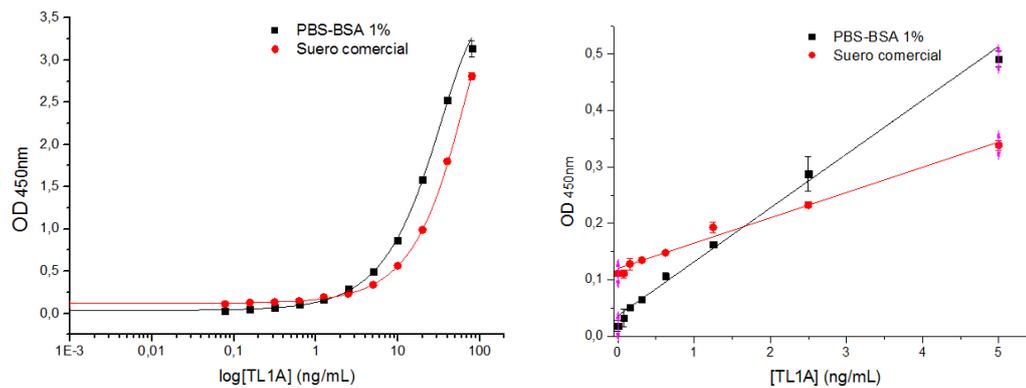


Figura 270. Curvas de detección de TL1A en PBS-BSA 1% y en suero comercial, utilizando el par A2-b/D1. En la figura de la derecha se muestra el rango lineal de las curvas.

A pesar de que se obtuvieron buenos resultados preliminares porque el ensayo diseñado fue capaz de detectar TL1A en suero comercial, se intentó buscar alguna condición a la cual dicha curva se asemejara lo

mejor posible a la obtenida utilizando PBS-BSA 1%, evaluando diferentes variantes de soluciones diluyentes que nos permitieran disminuir la interferencia del suero en la señal final sin realizar diluciones importantes del mismo para no perder sensibilidad. Esto es beneficioso si se desea comercializar un kit de estas características, ya que si se logra que la curva del estándar del ensayo pueda ser realizada en una solución de uso común en el laboratorio, y además refleje lo mejor posible el comportamiento de las muestras, simplifica el ensayo y lo hace menos costoso.

En muchos kits comerciales se sugiere la dilución de muestras de suero previo a su incubación en el ensayo. Siguiendo esta línea, se realizaron distintas diluciones del suero comercial en PBS (previo a ser adicionado con TL1A), con el objetivo de disminuir las interferencias que pudieran estar afectando las señales del ensayo.

La dilución de 50% de suero en PBS mejoró las señales obtenidas a altas concentraciones de TL1A, pero no disminuyó la señal de ruido de fondo del ensayo (fig. 41). El comportamiento de la dilución de 80% de suero en PBS no mostró diferencias respecto al suero sin diluir. Por lo tanto, aunque se podrían realizar diluciones de suero mayores, esta estrategia no es una opción atractiva ya que diluir la muestra implica disminuir la concentración de TL1A incubado, y por lo tanto, podría darse el caso de caer por debajo del límite de detección del ensayo aunque la muestra

original contuviera niveles de TL1A por encima del mismo, derivando en una disminución indirecta en la sensibilidad del ensayo.

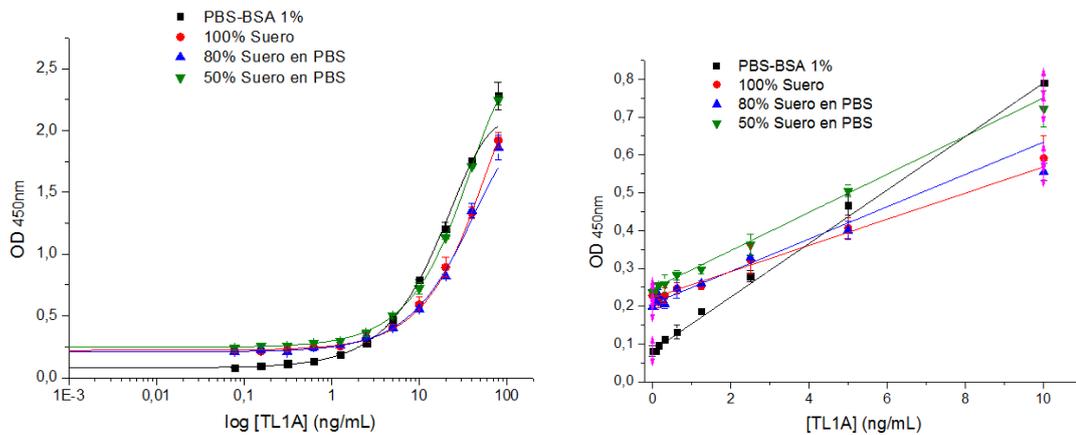


Figura 281. Curvas de TL1A en PBS-BSA 1% y en distintas diluciones de suero comercial en PBS. A la derecha se muestra el rango lineal de las curvas.

Otra estrategia que se probó fue diluir el suero comercial en PBS-BSA-Tween. La BSA podría disminuir el ruido de fondo del ensayo en caso de que se despegaran proteínas adsorbidas a la placa, mientras que el Tween es un detergente que disminuye las interacciones inespecíficas. Para las diluciones se empleó 90% de suero en 10% de PBS-BSA-Tween 10x, es decir utilizando concentraciones finales de BSA de 1% y probando dos concentraciones de Tween finales: 0,05% y 0,1%.

Las curvas obtenidas con el suero comercial diluido en PBS-BSA-Tween no presentaron cambios sustanciales con respecto al comportamiento del suero comercial sin diluir (fig. 42). Si bien se observó un leve descenso

del ruido de fondo al utilizar BSA y Tween, estas curvas siguen presentando malas recuperaciones en relación a la curva con PBS-BSA 1%. Además no se observó diferencia para las dos concentraciones de Tween utilizadas.

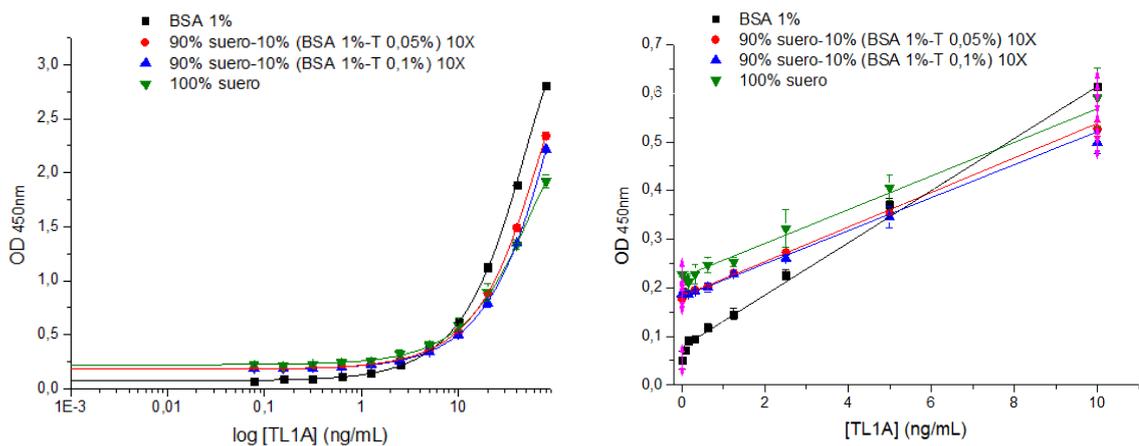
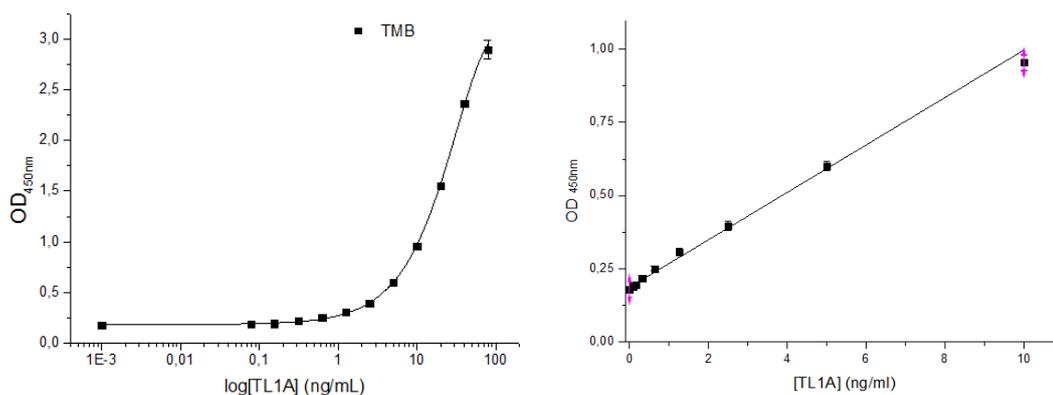


Figura 292. Curvas de TL1A en PBS-BSA 1% y en suero comercial diluido en 10% de (BSA 1%-Tween 0,05%) 10x o (BSA 1%-Tween 0,1%) 10x en PBS. A la derecha se muestra el rango lineal de las curvas.

En un intento por disminuir el ruido de fondo del ensayo utilizando suero comercial, se comparó la utilización de OPD en lugar de TMB como sustrato de la peroxidasa para el revelado. El OPD es un sustrato que suele arrojar menores señales que el TMB, y por lo tanto se utiliza en ensayos propensos a subir la señal de ruido de fondo, como es nuestro caso. En ambos casos se respetaron los mismos tiempos de incubación y de revelado, y se realizaron las mismas diluciones de los VHHs y el

conjugado. Se utilizó el par A1-b/D1, a las mismas concentraciones que se estaban empleando (25 $\mu\text{g/mL}$ y 3 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente).

De acuerdo con lo esperado, cuando se emplea TMB las señales obtenidas son mayores en comparación con las de OPD (fig. 43). Los límites de detección obtenidos para ambos casos son similares, siendo de 127 pg/mL para OPD y de 78 pg/mL para TMB. Sin embargo, se puede observar que a bajas concentraciones de TL1A (entre 78 y 625 pg/mL) las señales utilizando OPD no aumentan significativamente con respecto a la dilución anterior, y presentan mayores desviaciones entre los valores de las réplicas. Por el contrario, mejores resultados se obtienen utilizando TMB, con el cual además se observa un claro comportamiento lineal en el rango de 0-10 ng/mL de TL1A, mientras que la curva obtenida utilizando OPD mantiene la linealidad hasta 5 ng/mL , lo cual acota el rango de cuantificación del ensayo. Por lo tanto, se decidió continuar utilizando TMB como sustrato del revelado.



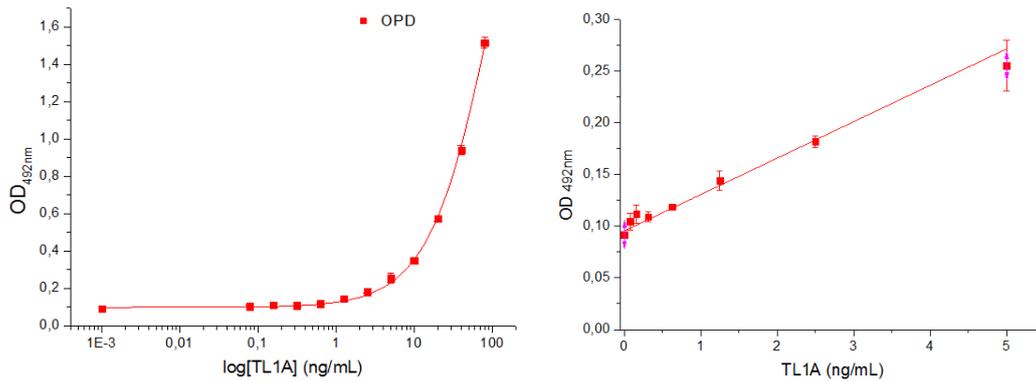


Figura 303. Curvas de TL1A en suero comercial, comparando dos sustratos de la peroxidasa en el revelado: TMB y OPD. A la derecha se muestra el rango lineal correspondiente a cada curva.

3.10 Exploración de potenciales VHHs de captura y su comportamiento frente a la exposición al suero comercial humano

Los ensayos realizados anteriormente se basaron en el par de anticuerpos que se habían seleccionado utilizando PBS-BSA1% como diluyente del analito. Se quiso evaluar la posibilidad de que el suero estuviera interfiriendo con la interacción entre el anticuerpo de captura elegido (A2-b) y TL1A. El VHH de captura es el único anticuerpo del ensayo expuesto al contacto con el suero ya que el VHH de detección se adiciona luego de los lavados tras incubación con éste. Por lo tanto, para evaluar la posibilidad de que los componentes del suero afectaran de alguna manera la interacción entre A2-b y TL1A, se prosiguió a probar distintos VHHs de captura para realizar curvas de TL1A en suero comercial, sin variar el anticuerpo de detección.

Para la sensibilización de la placa se probaron los otros dos VHHs que se habían seleccionado a partir del ranking de afinidades (C4-b y E6-b) y se utilizó al clon D1 como VHH de detección, manteniendo las concentraciones de VHHs que se estaban utilizando.

Para los dos VHHs de captura evaluados se observó una marcada desmejora de la sensibilidad del ensayo por TL1A en comparación con los resultados utilizando el clon A2-b (fig. 44).

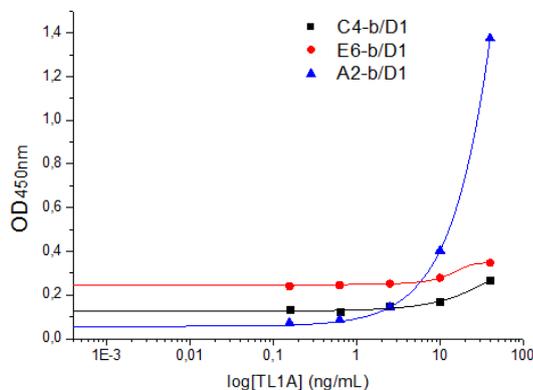


Figura 314. Curvas de TL1A en suero comercial probando distintos VHHs de captura biotinilados (25 µg/mL), y D1 (3 µg/mL) como VHH de detección.

Con el objetivo de probar otros VHHs de captura se utilizó el formato de ELISA sándwich basado en el uso de la S-PO, a pesar de que no se encontraba puesto a punto. Para la sensibilización se utilizaron los VHHs C1 y D1 a 25 µg/mL, y para la detección se utilizó A2-b y C4-b a 3 µg/mL.

De todas las combinaciones probadas el par D1/C4-b fue el que presentó una mayor sensibilidad por el analito (fig. 45), sin embargo presentó una

señal de ruido de fondo alta, baja sensibilidad y baja señal máxima en comparación con las curvas obtenidas con el par A2-b/D1. Paradójicamente, el clon A2-b mostró ser un muy mal VHH de detección en estas circunstancias en comparación con C4-b (fig. 45).

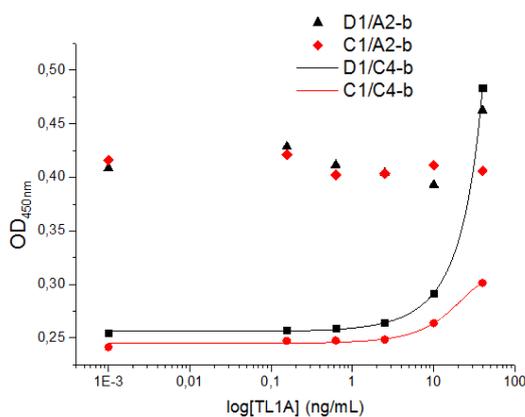


Figura 325. Curvas de TL1A en suero comercial, explorando distintas combinaciones de VHHs. Para la sensibilización se utilizaron VHHs sin biotinilar (C1 y D1) a 25 $\mu\text{g/mL}$, y para la detección VHHs biotinilados (A2-b y C4-b) a 3 $\mu\text{g/mL}$.

A partir de estos resultados se puede concluir que de todas las combinaciones de VHHs que se ensayaron bajo estas condiciones (VHH de captura a 25 $\mu\text{g/mL}$ y VHH de detección a 3 $\mu\text{g/mL}$), no se encontró ningún otro par que detectara TL1A con mayor sensibilidad que el que se estaba utilizando hasta el momento (A2-b/D1). Esto significó una reafirmación de que se habían seleccionado buenos VHHs para que conformaran el ensayo, por lo que se decidió seguir trabajando con estos clones.

3.11 Optimización del ensayo de ELISA desarrollado utilizando suero comercial humano como matriz

Una vez que se decidió continuar trabajando con el par A2-b/D1, se resolvió utilizar el suero comercial como solución diluyente del TL1A para la curva estándar, sin ningún tipo de adición, e intentar optimizar las cantidades de anticuerpos en el ensayo para disminuir la señal de ruido de fondo y lograr obtener un buen límite de detección con un amplio rango de linealidad.

Con dicho fin se realizó un *checkerboard* (o “método en damero”) en donde se exploraron distintas combinaciones de concentración en la sensibilización y en el VHH de detección en el ELISA. Se probaron 3 concentraciones de A2-b en el *coating* (25 µg/mL, 12,5 µg/mL y 6,25 µg/mL) y 4 concentraciones de D1 como VHH de detección (10 µg/mL, 5 µg/mL, 2,5 µg/mL y 1,25 µg/mL). Para cada condición se incubó con 3 diluciones de TL1A en suero comercial: 80 ng/mL, 8 ng/mL y 0 ng/mL.

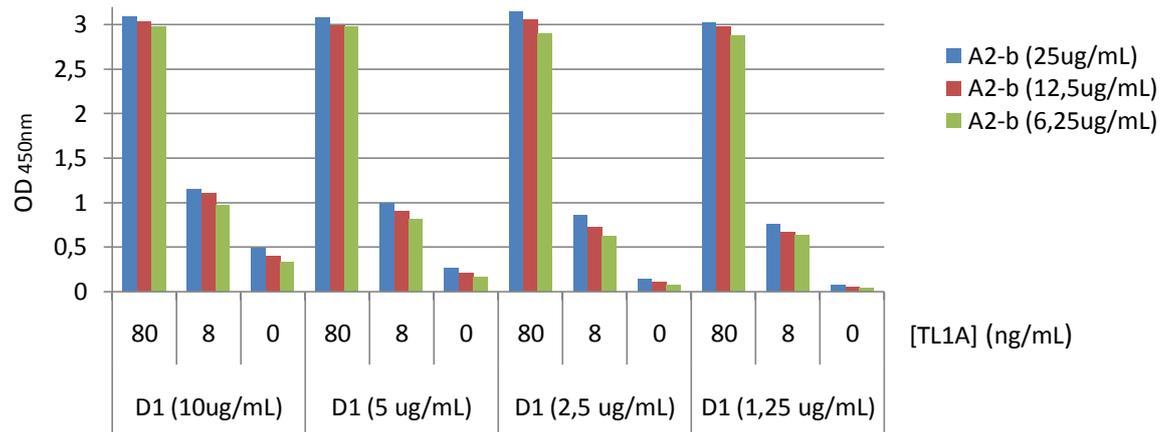


Figura 336. Exploración de distintas concentraciones de VHH de captura (A2-b) y de detección (D1) en ELISA sándwich para TL1A en suero comercial.

A partir de los resultados obtenidos en esta prueba, representados en la figura 48, se observa que utilizando el anticuerpo de detección D1 a concentraciones mayores a 2,5 $\mu\text{g/mL}$ el ruido de fondo del ensayo se vuelve inaceptable sin importar la condición de sensibilización. Sin embargo, el ruido de fondo disminuye sensiblemente al utilizar D1 a menores concentraciones, sin que esto resulte en detrimento significativo de las señales obtenidas a 8 u 80 ng/mL.

A partir de estos datos, se prosiguió con la puesta a punto del ensayo eligiendo la mayor concentración de sensibilización analizada: 25 $\mu\text{g/mL}$ de A2-b (ya que mayores concentraciones de sensibilización implican una mayor sensibilidad del ensayo), y se probaron distintas concentraciones del VHH de detección D1, no mayores a 2,5 $\mu\text{g/mL}$, realizando en este caso la curva completa del estándar de TL1A en suero comercial.

Se observó que el ruido de fondo del ensayo disminuyó unas 4 veces cuando se utilizó D1 a 0,625 µg/mL en comparación con la condición de 2,5 µg/mL. También se observó una disminución en el límite de detección del ensayo, siendo la mejor condición la de D1 a 0,625 µg/mL, para la cual se obtuvo un límite de detección de 55 pg/mL de TL1A. Los límites de detección se calcularon a partir de 5 experimentos en días diferentes y realizando cada curva por triplicado cada vez.

Además, como se puede observar en la figura 47, el rango de linealidad de las curvas abarca de 0 a 10 ng/mL, permitiendo detectar concentraciones de TL1A en un rango de 55 pg/mL a 10 ng/mL en el mejor de los casos ensayados, lo cual resulta muy adecuado tomando en cuenta que los valores de TL1A reportados en la literatura para casos normales y de enfermedad van desde 100 pg/mL hasta 15 ng/mL aproximadamente.

Si bien utilizar suero comercial como diluyente de la curva estándar encarece el ensayo, éste se asemeja mucho más a las muestras a medir que la BSA 1% en PBS, por lo que *a priori* se podría sugerir que resolvería mejor los problemas asociados con las posibles interferencias provenientes de sueros de diferentes individuos que se pudieran presentar.

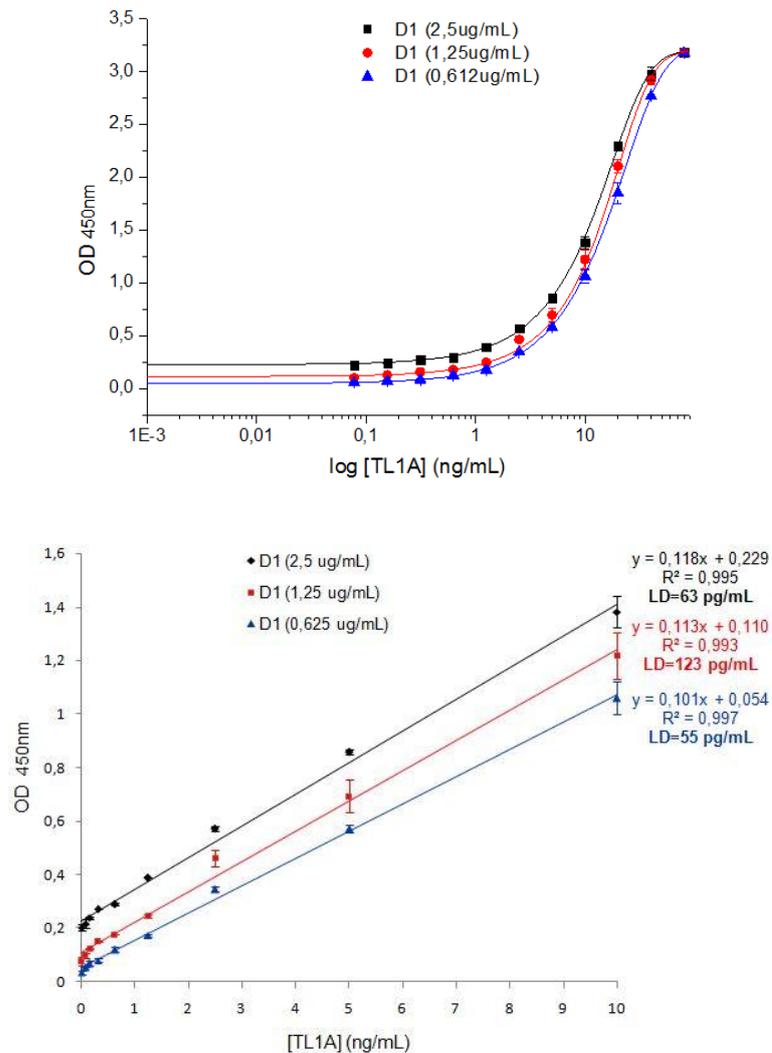


Figura 347. Curvas de TL1A en suero comercial, evaluando distintas concentraciones de VHH de detección (D1). En la figura de abajo se muestra el rango lineal de las curvas. Representativa de 5 ensayos realizados en diferentes momentos, donde cada curva se realizó por triplicado.

3.12 Comparación del ensayo de ELISA generado con el ensayo comercial

El próximo paso de este trabajo consiste en la validación del kit generado con sueros de pacientes reales. Para ello es necesario contar con alguna

herramienta de medición de TL1A contra la cual se puedan comparar los datos obtenidos con el kit que se ha desarrollado. Para eso se adquirió un kit de ELISA tipo sándwich (basado en el uso de anticuerpos convencionales) desarrollado por la empresa Peprotech para investigación, del cual se ha reportado su uso en diversas publicaciones (Al-Lamki et al., 2008; Bamias et al., 2010; Bamias et al., 2008; Bamias et al., 2013; Konsta et al., 2013; Stamatelopoulos et al., 2015). Existen otros kits del estilo disponibles para investigación, pero el número de trabajos publicados en la literatura que avalan su uso es significativamente menor.

El primer paso para poder comparar los resultados de ambos kits era corroborar que los estándares de TL1A utilizados por ambos eran comparables. Cabe recordar que el estándar de TL1A que se utilizó en nuestro kit fue producido, purificado y cuantificado en nuestro laboratorio.

Con este fin, se realizaron curvas de ambos estándares de TL1A en suero comercial, utilizando el ensayo puesto a punto en nuestro laboratorio con el par A2-b/D1. Se obtuvieron curvas muy similares a partir de las dos proteínas de distinto origen (fig. 48), lo cual indica que el estándar que se estaba utilizando se encontraba producido y cuantificado de forma correcta.

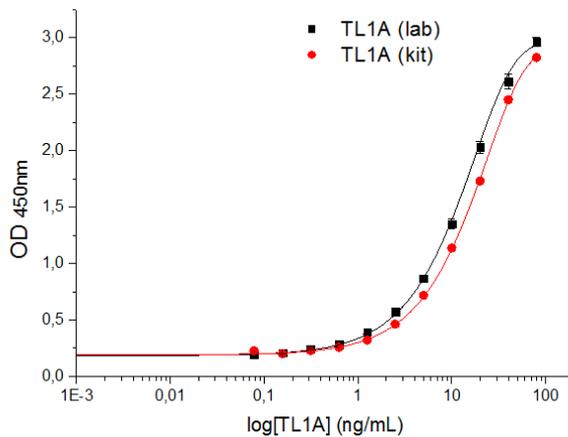


Figura 48. Curvas de detección de TL1A en suero comercial utilizando el ensayo desarrollado en el laboratorio. Se comparó el estándar de TL1A producido en el laboratorio (en negro) y el provisto por el kit comercial (en rojo).

Como segundo paso se quisieron medir los niveles de TL1A en el suero comercial con el que realizamos la curva de calibración del ensayo, ya que si bien corresponde a donantes sanos, podía darse el caso de que sus niveles fueran superiores a los límites de detección del ensayo, como se había reportado para varios casos de individuos sanos en la literatura.

Los resultados que se obtuvieron a partir del kit comercial se alejan de lo reportado por los fabricantes. A partir de la curva de calibración, utilizando el sustrato ABTS/H₂O₂ de la peroxidasa, se observó que la absorbancia máxima obtenida con 8 ng/mL de TL1A no alcanzaba un valor de 0,2 UA (resultados no mostrados), y que el límite de detección del ensayo era mucho mayor que el reportado por el fabricante (que corresponde a 62 pg/mL). Suponiendo que la avidina-PO provista por el kit estuviera en mal estado, se chequeó tanto la unión de la avidina a biotina (sensibilizando pocillos de ELISA con A2-b a diferentes concentraciones) y la actividad enzimática de la PO comparándola con la estreptavidina-PO

rutinariamente utilizada en el laboratorio a la dilución adecuada, y las señales de absorbancia obtenidas fueron muy similares entre ambos conjugados, utilizando TMB/H₂O₂ como sustrato de la peroxidasa (resultados no mostrados). También se utilizó el sustrato de la peroxidasa recomendado por el kit (ABTS) de forma más concentrada a la que se sugiere, esperando observar un aumento en las señales para concentraciones altas de TL1A, suponiendo que el reactivo estuviera en mal estado. La señal general del ensayo aumentó (incluido el *background*), pero la pendiente de la curva obtenida no varió, con lo cual se puede concluir que el sustrato estaba en buenas condiciones (resultados no mostrados).

Al obtener tan bajas señales con el kit comercial cuando se reveló con ABTS/H₂O₂, se probó utilizar el sustrato TMB/H₂O₂, que desarrolla señales de color más intensas que el ABTS/H₂O₂. El ruido de fondo del ensayo en este caso fue muy alto (0,67 UA) (fig. 49). El límite de detección del ensayo, estimado a partir de los resultados obtenidos, se aleja ampliamente de lo reportado por los fabricantes, hallándose en el orden de ng/mL.

A pesar de que se siguieron todas las instrucciones del fabricante, no fue posible reproducir sus resultados. Además, se trata de un kit costoso que provee de una escasa cantidad de reactivos (los necesarios para realizar el ensayo en aproximadamente 100 pocillos de ELISA), por lo tanto las

pruebas realizadas intentando poner a punto este ensayo agotaron los reactivos.

Aunque el ruido de fondo del ensayo fue alto, se quiso medir la concentración de TL1A presente en el suero comercial que utilizamos en nuestro ensayo por las razones que explicamos con anterioridad. Además, realizamos adiciones de TL1A (tanto la proveniente del kit comercial, como de nuestro laboratorio) a dicho suero, para evaluar el comportamiento del kit al utilizar una muestra de suero con concentraciones conocidas (la correspondiente al suero sumada a la adicionada) de analito.

En el caso del suero comercial, las señales de absorbancia obtenidas fueron de alrededor de 2,5 UA para todas las concentraciones de TL1A probadas y también para el *background* (figura 49). Esta señal supera ampliamente a la observada para una concentración de TL1A de 16 ng/mL en PBS-BSA 1%. Esta observación no es coherente con lo esperado en el caso de donantes sanos y con parámetros analíticos normales de inflamación. Los niveles promedio de TL1A en individuos sanos (controles) no superan en ningún estudio los 900 pg/mL de TL1A. Por estas razones creemos que el kit de esta casa comercial no es adecuado para medir TL1A en suero sin diluir, aunque su protocolo indique lo contrario. Además, por esta razón es que no se puede conocer aún la concentración de TL1A del suero que elegimos como matriz para nuestra curva estándar. Por otra parte, las adiciones de TL1A al suero no

redundaron en aumento de la señal de absorbancia, indicando que los porcentajes de recuperación del analito son nulos, probablemente porque la interferencia de componentes del suero es tan alta que satura la actividad enzimática de la peroxidasa.

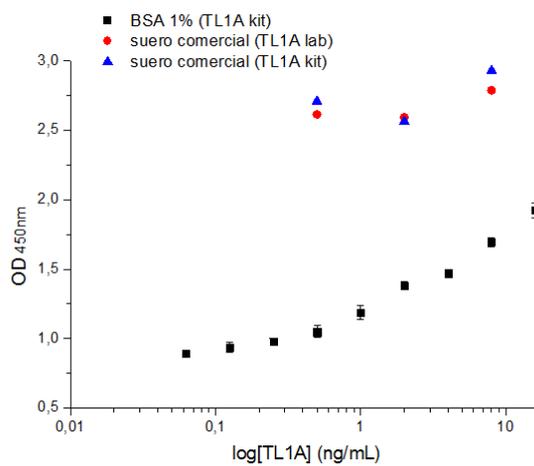


Figura 49. Curva estándar de detección de TL1A del kit comercial (revelado con TMB/H₂O₂). La curva estándar se realizó en PBS-BSA 1% según las instrucciones del fabricante, entre las concentraciones de TL1A de 0-16 ng/mL. En este gráfico se muestran además los resultados obtenidos para adiciones realizadas en suero comercial humano, con el TL1A recombinante provisto por el kit (en azul) y el producido en el laboratorio (en rojo).

4 DISCUSION

Como ya se ha mencionado a lo largo de este trabajo, TL1A ha sido vinculado a distintas enfermedades autoinmunes o autoinflamatorias crónicas, y se ha descrito que sus niveles séricos se correlacionan adecuadamente con el cuadro clínico del paciente en las diferentes fases de algunas de estas enfermedades. Por lo tanto se propone que podría ser utilizado como un biomarcador para el diagnóstico o el seguimiento de la actividad de las mismas (Bamias et al., 2010; Bamias et al., 2008; Cassatella et al., 2007; Konsta et al., 2013; Xiu et al., 2015). En esta línea creemos que el diseño de un método robusto de detección y cuantificación para esta proteína, que tras su validación pudiera ser utilizado clínicamente, podría representar un avance significativo al respecto.

El uso de *nanobodies* para el diseño de inmunoensayos está comenzando a ser explorado por distintos grupos de investigación. Los *nanobodies* presentan numerosas ventajas desde el punto de vista biotecnológico con respecto a los anticuerpos convencionales, lo cual los hace buenos candidatos para el desarrollo de inmunoensayos (Muyldermans, 2013).

En este trabajo se produjeron VHHs en sistemas de expresión procariotas consiguiendo un alto rendimiento en términos de cantidad de proteína/litro de cultivo, y con alto grado de pureza, que se mantuvieron estables tras

ciclos de congelado-descongelado durante más de un año. Por otra parte, también se demostró la versatilidad que tienen los VHHs de ser clonados a distintos vectores de expresión, permitiendo su asociación a distintos *tags* o a la biotina, lo cual deriva en la posibilidad de poder evaluar su desempeño en diferentes diseños de ELISA, permitiendo una mejor optimización del ensayo. Esta es una diferencia importante de los VHHs respecto a los anticuerpos convencionales, los cuales no pueden ser manipulados genéticamente de forma sencilla. Es de destacar que muchos de los anticuerpos que se utilizan en los kits comerciales son policlonales, por lo que las cantidades que se obtienen son finitas (aquellas que se obtienen tras el sangrado total del animal inmunizado). En el caso de los VHHs, además de que se pueden producir con alta eficiencia, la fácil conservación de su información genética en plásmidos de expresión procariota, o en la cepa bacteriana correspondiente, hace que se puedan producir cuantas veces sea necesario, de forma que es difícil pensar en una posible pérdida de los clones (en el caso de los anticuerpos monoclonales, los hibridomas pueden ser conservados en nitrógeno líquido durante años, pero es necesario chequear su estado cada cierto período de tiempo para asegurarse de que las células eucariotas no pierden capacidad de replicarse).

También cabe destacar que el aislamiento de clones específicos de TL1A en este trabajo fue muy eficiente, lo que respalda la estrategia elegida basada en la tecnología de generación de bibliotecas de VHHs en fagos

filamentosos a partir de un animal inmunizado con la proteína recombinante. En nuestro país existen condiciones favorables para desarrollar este tipo de estrategias gracias a la buena disposición y profesionalidad de los veterinarios a cargo del Zoológico Parque Lecocq de la IMM (los protocolos éticos de manipulación de dichos animales están aprobados por la Comisión Nacional de Experimentación Animal).

A partir de la biblioteca de VHHs obtenida, se evaluaron gran variedad de clones específicos para TL1A, y se realizaron estrategias que permitieron identificar un par de anticuerpos que generó un ensayo con una alta sensibilidad, similar a la reportada por los kits comerciales. Por lo tanto, podemos concluir que el proceso de optimización del ensayo llevado a cabo fue exitoso.

Se logró generar un ensayo de ELISA tipo sándwich para TL1A humano a partir de dos clones diferentes: A2-b como VHH de captura y D1 como VHH de detección, el cual es reconocido por un anticuerpo anti-HA-HRP.

Este diseño podría presentar aún un margen de mejora en términos de sensibilidad si fuera necesario. Una estrategia que se sugiere para este fin es la de utilizar una mezcla de VHHs de detección, sumando otros clones aislados en el trabajo al anticuerpo original D1 (ej: B4, C1, D4). El requerimiento que estos clones deben cumplir para este fin es reconocer epítopes diferentes de TL1A (no competir por el sitio de unión al analito). Para elegir aquellos que cumplan con este requerimiento se podría utilizar

el sistema BLItz^R disponible en nuestro laboratorio que permite detectar interacciones proteicas sin necesidad de marcarlas o conjugarlas, y medir cinéticas y constantes de afinidad. En este caso nos permitirá discernir si dos anticuerpos se unen al mismo epítotope en la molécula de TL1A o a epítotope diferentes. Esta aproximación experimental ya fue puesta a punto en el laboratorio por otro investigador en su tesis de doctorado (Martín Rossotti).

En una etapa posterior del trabajo, y en un intento por simplificar el ensayo, tomando en cuenta la versatilidad que presentan los VHHs de poder ser fusionados a diferentes *tags*, se intentó cambiar el formato original por uno en el cual el VHH de detección estuviera biotinilado y pudiera ser reconocido por la estreptavidina-HRP (S-HRP), un reactivo más económico y ampliamente utilizado en laboratorios dedicados a diversas áreas de investigación.

Si bien las pruebas realizadas con este formato son preliminares y no es posible reportar valores de límites de detección confiables, se puede decir que el formato basado en la S-HRP muestra una sensibilidad similar al formato inicialmente desarrollado. Es de destacar que constantemente surgen en el mercado versiones de la S-HRP que permiten mejorar la sensibilidad de los ensayos. Al respecto se puede citar una versión de la casa comercial Thermo Scientific (PierceTM High Sensitivity Streptavidin-HRP, #21130 o 21132) que provee una amplificación de la señal considerable, sin aumentar el *background* del ensayo gracias a la

conjugación de la estreptavidina a una larga cadena de unidades de HRP. En nuestro laboratorio se cuenta con experiencia al respecto: este reactivo permitió mejorar de 10 a 100 veces la sensibilidad en términos de EC50 en inmunoensayos de detección de haptenos (Vanrell et al., 2013), por lo que es lógico pensar que pudiera ocurrir algo similar en nuestro caso. En este sentido, creemos que existe un gran margen de mejora del límite de detección en nuestro ensayo si se toma en cuenta la posibilidad de emplear a la S-HRP de alta sensibilidad.

De todas maneras, como ya se ha mencionado, el límite de detección obtenido con nuestro ensayo es del mismo orden que del reportado para el kit de la empresa Peptotech. Nuestro ensayo presenta la ventajas adicionales al previamente mencionado, ya que la curva estándar presenta un amplio rango lineal, a diferencia de la del kit comercial al cual no se pueden aplicar los ajustes clásicos (sigmoide o lineal). Esto deriva en que con nuestro ensayo se pueden obtener resultados más exactos y confiables, ya que se puede calcular la concentración de TL1A intrapolando los datos de absorbancia de las muestras a partir de la ecuación de una recta que toma en consideración parámetros importantes como la desviación de los datos de la curva estándar. Nuestro kit presentó un rango de linealidad en PBS-BSA 1% de 0 a 5 ng/mL de TL1A, adecuado para la detección de TL1A en suero humano según los niveles reportados en la literatura.

Por otra parte, a pesar de que en nuestras manos no se hayan obtenido resultados coherentes a partir del kit comercial, hay estudios publicados en los cuales se reportan resultados satisfactorios con dicho ensayo (Al-Lamki et al., 2008; Bamias et al., 2010; Bamias et al., 2008; Bamias et al., 2013; Konsta et al., 2013; Stamatelopoulos et al., 2015). Sin embargo, se debe destacar la gran variación en los niveles séricos de TL1A en individuos sanos reportados por los diferentes grupos de investigación. Por ejemplo, se han reportado medias de concentración en sueros de individuos sanos de TL1A tan dispares como las siguientes: $0,89 \pm 0,89$ pg/mL (Bamias et al., 2008) por un lado, y $226,7 \pm 48,24$ pg/mL (Konsta et al., 2013), utilizando el mismo kit. Otros autores reportan los datos en medianas y/o rangos de TL1A en sueros de individuos sanos, como es el caso del estudio de Bamias et al, 2010: 187,4 pg/mL, con un rango de 0-2.166 ng/mL, o el de Song 2013, que reporta un rango similar, pero no informa la mediana. Por otra parte, de estos estudios se desprende que los niveles de TL1A que para algunos autores caen dentro del rango de normalidad, para otros autores indican enfermedad en fase activa. Esto se ilustra claramente al comparar los niveles de individuos con Espondilitis Anquilosante en fase activa (Konsta et al., 2013): 581 ± 157 pg/mL, con los niveles de TL1A de individuos sanos en un estudio de AR: $0,89 \pm 0,89$ ng/mL (Bamias et al., 2008).

Estos resultados indican que el kit comercial no es robusto en términos de reproducibilidad inter-laboratorios, ya que se debería poder establecer un

rango de concentraciones normales de TL1A, como lo es para el caso de la proteína C reactiva, la albúmina y demás marcadores en suero humano. Esto es indispensable si se desea trasladar el ensayo para su uso en la clínica. Estas consideraciones avalan aún más nuestro interés por validar nuestro ensayo consiguiendo evitar estas discordancias observadas para el kit utilizado más extensamente.

Un paso clave en el desarrollo de kits de ELISA este tipo es el análisis de los porcentajes de recuperación del ensayo al adicionar diferentes concentraciones de TL1A a la matriz biológica en la cual estará presente el analito a medir en forma rutinaria. En nuestro caso, esa matriz es suero humano, que puede presentar interferencias en la detección del analito ya que su composición es mucho más compleja que la de la solución elegida para optimizar el ensayo (PBS-BSA1%). El porcentaje de recuperación en suero se refiere al cociente entre la señal del ensayo obtenida tras la adición de una concentración conocida de TL1A en suero humano (comercial en nuestro caso) y la señal obtenida para esa misma concentración de TL1A en la solución utilizada para realizar la curva estándar del ensayo, multiplicado por 100.

En el caso de nuestro ensayo, los porcentajes de recuperación en suero se apartaron del rango aceptado convencionalmente (80%-120%), y no se logró una buena correlación entre ambas matrices con las variaciones que se ensayaron.

Por lo tanto se prosiguió a utilizar como matriz de la curva estándar un suero humano comercialmente disponible, consistente en un pool de sueros humanos provenientes de individuos sanos, cuya composición se estima que será muy similar a la de las muestras de suero humanas que se evaluarán en un futuro. Con la curva estándar realizada en dicha matriz se logró re-optimizar el ensayo, logrando un límite de detección similar al obtenido para la matriz PBS-BSA 1%, y además obteniendo un rango de linealidad más amplio que el anterior (0-10 ng/mL).

4.1 Perspectivas a futuro

En primer lugar queda pendiente evaluar el contenido de TL1A en el suero comercial humano que se ha utilizado como matriz. Si bien el mismo proviene de donantes sanos y se espera que los niveles de TL1A sean bajos, cabe la posibilidad de que puedan ser detectados con nuestro ensayo y con el kit comercial, por lo tanto es importante verificar la concentración basal de TL1A en el suero comercial. Con este fin, hemos adquirido otro lote del kit de la empresa Peprotech y nos pondremos en contacto con la casa comercial con el fin de obtener mayor información que nos permita solucionar los problemas que hemos tenido. Contar con un ensayo que nos permita validar nuestros datos es necesario para todo el proceso que resta, por lo cual dedicaremos esfuerzos a poder

reproducir los resultados reportados por la casa comercial Preprotech en nuestro laboratorio.

Otro punto que queda pendiente es evaluar la reactividad cruzada de nuestro ensayo con otros miembros de la familia de TNF que puedan encontrarse en forma soluble en suero humano en condiciones de enfermedad, principalmente TNF- α , sCD40L y sTRAIL, miembros de la familia de TNF que presentan mayor homología con TL1A (Zhan et al., 2009). Con este fin ya hemos adquirido las proteínas recombinantes de la empresa Peprtech.

Una vez abordados dichos puntos, nos proponemos validar nuestro ensayo, evaluando muestras reales de individuos saludables y enfermos, y comparar los resultados obtenidos con el kit comercial. Además, realizaremos adiciones de estos sueros con concentraciones conocidas de TL1A y calcularemos los porcentajes de recuperación de forma similar a la explicada anteriormente en esta sección.

Es de destacar que la matriz que se ha elegido para la curva estándar de nuestro ensayo consiste en un suero comercial humano deslipidizado, lo cual debe ser tenido en cuenta ya que muchos inmunoensayos son afectados por los niveles de lípidos en el suero (aún de sueros extraídos en ayunas). Por lo tanto, es posible que el componente lipídico de los sueros pueda afectar los porcentajes de recuperación de nuestro ensayo. Para ello, una opción que nos proponemos es deslipidizar previamente los

sueros utilizando un protocolo sencillo que puede ser llevado a cabo en 30 minutos, basado en el uso de butanol y di-isopropil-éter (Cham and Knowles, 1976), y que asemejará aún más la composición de las muestras con la de la matriz empleada.

Con este fin de conseguir un amplio pool de sueros tanto de individuos sanos como de pacientes con artritis reumatoide (AR) y espondilitis anquilosante (EA) nos propusimos establecer colaboraciones con laboratorios clínicos públicos como el del Instituto Nacional de Reumatología "Dr. Moisés Mizraji". Para ello hemos establecido los primeros contactos con actores relevantes de dicha institución, y se ha elevado un protocolo ético con el correspondiente consentimiento informado para el paciente, a la dirección de dicha entidad, con el objetivo de poder validar el ensayo estableciendo un rango de normalidad aceptable de TL1A, y reproducible en el tiempo y en distintos laboratorios. También es de nuestro interés correlacionar los niveles de TL1A de los individuos enfermos con la actividad de las enfermedades, para lo cual se cuenta con la colaboración del Dr. Daniel Palleiro del Instituto Nacional de Reumatología, y del director del Laboratorio de dicha entidad, que nos proveerán de los sueros de pacientes con AR y EA, una vez que el protocolo ético sea aprobado por las autoridades competentes. Si a partir de estos ensayos se obtienen buenos resultados, el fin último de esta investigación es poner a disposición el kit a nivel nacional, como ya ha hecho en otras oportunidades con otros kits desarrollados en nuestro

laboratorio que están siendo (o han sido) utilizados con éxito por entidades estatales tales como el MSP (Comisión Nacional de Zoonosis), UTE, OSE y la IMM.

5 GLOSARIO

Background: señal de absorbancia de un inmunoensayo (en este caso) correspondiente a concentración nula del analito detectado por el ensayo. También se utiliza la terminología “ruido de fondo” del ensayo para referirse al mismo concepto.

Bibliotecas de fagos: preparaciones de fagos filamentosos que expresan en su superficie proteínas o péptidos de secuencia variable y contienen el ADN codificante para dichas secuencias en su genoma viral plasmídico modificado.

Coating: Se refiere al primer paso en un ensayo de ELISA (a los efectos de este trabajo) en el cual se incuba la placa con una proteína o VHH que se adsorben a los pocillos de la misma. Proteína de *coating*: se refiere a la proteína adsorbida de esta forma en el ensayo.

Especificidad: la capacidad que tiene un ensayo (en este caso el ELISA) para discernir entre el analito para el cual fue diseñado y otro diferente. En términos más generales, un ensayo será tanto más específico cuanto menor reactividad cruzada presente con analitos de estructura similar, o sea cuanto menos falsos positivos informe.

Fago helper: Fago cuyo genoma plasmídico provee a las células de las proteínas de la cápside viral así como de pIII sin fusionar, pero carece de

una señal de encapsidación eficaz. Se utiliza para generar partículas de fagos recombinantes en una primera instancia al construir una biblioteca (ya que el genoma recombinante de estos fagos no contiene toda la información genética para codificar la cápside viral) infectando bacterias previamente transformadas con los plásmidos virales recombinantes. También se utiliza para amplificar poblaciones de fagos de interés (por ej.: de un *output*), infectando bacterias previamente infectadas con dicha población.

Input. Población de fagos que se incuba con una molécula de interés para seleccionar aquellos con especificidad por la misma en una ronda de *panning*. Puede corresponder a la biblioteca intacta (si se trata de una primera ronda de *panning*) o a un amplificado de un *output* de una ronda de *panning* anterior.

Límite de detección: concentración de analito correspondiente al valor del blanco del ensayo más 3 desviaciones estándar del mismo. En este trabajo se calculó realizando 5 experimentos en días diferentes y cada curva por triplicado.

Output. Población de fagos eluida de una determinada ronda de *panning* contra una molécula de interés.

Output Amplificado: Población de fagos obtenida de un *output* de una ronda de *panning* que fue amplificada o replicada, mediante infección de bacterias permisivas con el *output* y posterior infección con un fago

helper. De esta manera, cada partícula viral obtenida de un *output* se replica varios órdenes de magnitud para poder realizar otra ronda de *panning*.

***Panning* o “selección”**: metodología utilizada para seleccionar específicamente, a partir de una biblioteca de fagos, aquellas variantes que interaccionan con una molécula de interés. Usualmente consiste en varias rondas consecutivas de selección. Cada ronda consta de la incubación de la biblioteca (o *output* amplificado) con la molécula de interés, lavados para quitar la fracción de fagos inespecífica para dicha molécula, y la elución de los fagos que interaccionaron específicamente con la molécula de interés. A dicha población de fagos específicos se le denomina *output* de la ronda de *panning*.

pfu: unidades formadoras de placa (en este trabajo se refiere a unidades de fago que infectaron bacterias dando como resultado colonias aisladas en una placa de agar con el antibiótico adecuado).

Phage display (“presentación en fagos”): técnica de laboratorio utilizada para el estudio de interacciones proteína-proteína, proteína-péptido, proteína-DNA, etc, basada en el uso de bacteriófagos (virus que infectan bacterias) que permiten conectar físicamente proteínas expresadas en su cápside, con la información genética que las codifica. En esta técnica, un gen codificante para una proteína (ej: un VHH) o péptido de interés se fusiona con el gen de una proteína de la cápside viral manipulando el

genoma viral plasmídico, y tras la producción del fago se consigue que éste presente la proteína de interés al exterior de la partícula consiguiendo conectar genotipo con fenotipo. Estos fagos pueden entonces ser incubados contra otras proteínas, péptidos o secuencias de ADN, con el fin de detectar la interacción entre la proteína que se muestra y las otras moléculas. Usualmente se utilizan bibliotecas de proteínas o péptidos en fagos para realizar selección de variantes que interaccionen con moléculas de interés.

Porcentajes de recuperación de TL1A en suero: Se refiere al cociente entre la señal del ensayo obtenida tras la adición de una concentración conocida de TL1A en suero humano comercial y la señal obtenida para esa misma concentración a partir de la curva estándar del ensayo (en este trabajo corresponde a PBS-BSA1%), multiplicado por 100. Los porcentajes de recuperación aceptados para un ELISA cuando se realizan adiciones o *spiking* de la matriz en la cual se presentará disuelto el analito van desde 80 a 120%.

Ranking de afinidades: Inmunoensayo que consta de varias etapas, y que fue realizado en este trabajo y descrito en un manuscrito que se encuentra en preparación en el laboratorio donde se realizó esta tesis. Ver secciones 2.7 de Materiales y Métodos y 3.3 de Resultados.

Reactividad: En un ensayo de ELISA reactividad se refiere al reconocimiento de un anticuerpo o par de anticuerpos por el analito que

se ensaya. Así, el término “**reactividad cruzada**” se refiere al reconocimiento por parte del ensayo, de moléculas diferentes al analito para el cual se desarrolló en primera instancia. Lo deseable para un inmunoensayo es presentar baja reactividad cruzada con moléculas similares al analito en cuestión que puedan presentarse en las muestras al ser evaluadas.

Screening: Cribado de una población de fagos en el cual se buscan aquellos específicos por la molécula de interés. Generalmente consta de un ELISA en el cual se sensibilizan los pocillos con la molécula de interés, y tras el bloqueo se incuban con clones aislados de fagos (o VHHs en el caso de este trabajo) detectando la unión mediante un anticuerpo conjugado específico de la cápside viral (o de un epítipo al cual el VHH está fusionado en este caso). De esta forma se pueden seleccionar aquellos fagos o VHHs específicos por la molécula de interés, y conocer su secuencia gracias al acoplamiento entre proteína-secuencia de ADN que existe en la metodología de *phage display*.

Sensibilidad: es la capacidad que tiene un ensayo (en este caso el ELISA) para detectar el analito. En términos más generales, un ensayo será más sensible cuanto menor concentración de analito sea capaz de detectar.

Spiking: Adición de analito (en este caso de TL1A) que se realiza a diferentes muestras (por lo general cuando la matriz en la cual se

encuentra disuelto el analito es diferente de la solución utilizada para la curva estándar), para calcular porcentajes de recuperación del analito en la matriz que en la que usualmente se encontrará el analito a medir.

Título de una preparación de fagos: cantidad de fagos por mililitro. Se calcula mediante la infección de bacterias con diferentes diluciones de la preparación de fagos, y plaqueando dichas bacterias en placas de agar con el antibiótico para el cual el genoma viral plasmídico tiene resistencia. Se asume que una colonia solamente puede ser infectada por un fago (ya que existen mecanismos que inhiben la infección posterior por otro de la biblioteca, aunque no del fago *helper*), por lo cual el número de colonias contadas representa el título de la preparación al expresarlo por mL de la misma.

6 REFERENCIAS

Aggarwal, B.B., Gupta, S.C., and Kim, J.H. (2012). Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* 119, 651-665.

Aiba, Y., and Nakamura, M. (2013). The role of TL1A and DR3 in autoimmune and inflammatory diseases. *Mediators of inflammation* 2013, 258164.

Al-Lamki, R.S., Wang, J., Tolkovsky, A.M., Bradley, J.A., Griffin, J.L., Thiru, S., Wang, E.C., Bolton, E., Min, W., Moore, P., *et al.* (2008). TL1A both promotes and protects from renal inflammation and injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 19, 953-960.

Bamias, G., Corridoni, D., Pizarro, T.T., and Cominelli, F. (2012). New insights into the dichotomous role of innate cytokines in gut homeostasis and inflammation. *Cytokine* 59, 451-459.

Bamias, G., Evangelou, K., Vergou, T., Tsimaratou, K., Kaltsa, G., Antoniou, C., Kotsinas, A., Kim, S., Gorgoulis, V., Stratigos, A.J., *et al.* (2011). Upregulation and nuclear localization of TNF-like cytokine 1A (TL1A) and its receptors DR3 and DcR3 in psoriatic skin lesions. *Experimental dermatology* 20, 725-731.

Bamias, G., Kaltsa, G., Siakavellas, S.I., Papaxoinis, K., Zampeli, E., Michopoulos, S., Zouboulis-Vafiadis, I., and Ladas, S.D. (2010). High intestinal and systemic levels of decoy receptor 3 (DcR3) and its ligand TL1A in active ulcerative colitis. *Clinical immunology* 137, 242-249.

Bamias, G., Mishina, M., Nyce, M., Ross, W.G., Kollias, G., Rivera-Nieves, J., Pizarro, T.T., and Cominelli, F. (2006). Role of TL1A and its receptor DR3 in two models of chronic murine ileitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 8441-8446.

Bamias, G., Siakavellas, S.I., Stamatelopoulos, K.S., Chrysochoou, E., Papamichael, C., and Sfikakis, P.P. (2008). Circulating levels of TNF-like cytokine 1A (TL1A) and its decoy receptor 3 (DcR3) in rheumatoid arthritis. *Clinical immunology* 129, 249-255.

Bamias, G., Stamatelopoulos, K., Zampeli, E., Protogerou, A., Sigala, F., Papamichael, C., Christopoulos, P., Kitas, G.D., and Sfikakis, P.P. (2013). Circulating levels of TNF-like cytokine 1A correlate with the progression of atheromatous lesions in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical immunology* 147, 144-150.

Barbas, C.F. (2001). *Phage display : a laboratory manual* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Bayry, J. (2010). Immunology: TL1A in the inflammatory network in autoimmune diseases. *Nature reviews Rheumatology* 6, 67-68.

Bhullar, M., Macrae, F., Brown, G., Smith, M., and Sharpe, K. (2014). Prediction of Crohn's disease aggression through NOD2/CARD15 gene sequencing in an Australian cohort. *World journal of gastroenterology : WJG* 20, 5008-5016.

Bjarnason, I. (1994). Intestinal permeability. *Gut* 35, S18-22.

Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., *et al.* (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385, 729-733.

Bodmer, J.L., Burns, K., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Thome, M., Bornand, T., Hahne, M., Schroter, M., Becker, K., *et al.* (1997). TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor receptor 1 and Fas(Apo-1/CD95). *Immunity* 6, 79-88.

Borysenko, C.W., Furey, W.F., and Blair, H.C. (2005). Comparative modeling of TNFRSF25 (DR3) predicts receptor destabilization by a mutation linked to rheumatoid arthritis. *Biochemical and biophysical research communications* 328, 794-799.

Bossuyt, X. (2006). Serologic markers in inflammatory bowel disease. *Clinical chemistry* 52, 171-181.

Brennan, F.M., Chantry, D., Jackson, A., Maini, R., and Feldmann, M. (1989). Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet* 2, 244-247.

Brown, M., Hughes, K.R., Moossavi, S., Robins, A., and Mahida, Y.R. (2014). Toll-like receptor expression in crypt epithelial cells, putative stem cells and intestinal myofibroblasts isolated from controls and patients with inflammatory bowel disease. *Clinical and experimental immunology* 178, 28-39.

Budhram, A., Chu, R., Rusta-Sallehy, S., Ioannidis, G., Denburg, J.A., Adachi, J.D., and Haaland, D.A. (2014). Anti-cyclic citrullinated peptide antibody as a marker of erosive arthritis in patients with systemic lupus erythematosus: a systematic review and meta-analysis. *Lupus* 23, 1156-1163.

Bull, M.J., Williams, A.S., Mecklenburgh, Z., Calder, C.J., Twohig, J.P., Elford, C., Evans, B.A., Rowley, T.F., Slebioda, T.J., Taraban, V.Y., *et al.* (2008). The Death Receptor 3-TNF-like protein 1A pathway drives adverse bone pathology in inflammatory arthritis. *The Journal of experimental medicine* 205, 2457-2464.

Cascino, I., Fiucci, G., Papoff, G., and Ruberti, G. (1995). Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. *Journal of immunology* 154, 2706-2713.

Cassatella, M.A., Pereira-da-Silva, G., Tinazzi, I., Facchetti, F., Scapini, P., Calzetti, F., Tamassia, N., Wei, P., Nardelli, B., Roschke, V., *et al.* (2007). Soluble TNF-like cytokine (TL1A) production by immune complexes stimulated monocytes in rheumatoid arthritis. *Journal of immunology* 178, 7325-7333.

Cavallini, C., Lovato, O., Bertolaso, A., Pacelli, L., Zoratti, E., Zanolin, E., Krampera, M., Zamo, A., Tecchio, C., Cassatella, M.A., *et al.* (2013). The TNF-family cytokine TL1A inhibits proliferation of human activated B cells. *PloS one* 8, e60136.

Coppieters, K., Dreier, T., Silence, K., de Haard, H., Lauwereys, M., Casteels, P., Beirnaert, E., Jonckheere, H., Van de Wiele, C., Staelens, L., *et al.* (2006). Formatted anti-tumor necrosis factor alpha VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism* 54, 1856-1866.

Croft, M. (2009). The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nature reviews Immunology* 9, 271-285.

Cham, B.E., and Knowles, B.R. (1976). A solvent system for delipidation of plasma or serum without protein precipitation. *Journal of lipid research* 17, 176-181.

Chao, K., Zhang, S., Yao, J., He, Y., Chen, B., Zeng, Z., Zhong, B., and Chen, M. (2014). Imbalances of CD4(+) T-cell subgroups in Crohn's disease and their relationship with disease activity and prognosis. *Journal of gastroenterology and hepatology* 29, 1808-1814.

Chapman-Smith, A., Turner, D.L., Cronan, J.E., Jr., Morris, T.W., and Wallace, J.C. (1994). Expression, biotinylation and purification of a biotin-domain peptide from the biotin carboxy carrier protein of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *The Biochemical journal* 302 (Pt 3), 881-887.

Chew, L.J., Pan, H., Yu, J., Tian, S., Huang, W.Q., Zhang, J.Y., Pang, S., and Li, L.Y. (2002). A novel secreted splice variant of vascular endothelial cell growth inhibitor. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16, 742-744.

Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Yu, G.L., Lyons, R.H., Garg, M., Duan, D.R., Xing, L., Gentz, R., Ni, J., and Dixit, V.M. (1996). Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science* 274, 990-992.

Darmawan, J., Rasker, J.J., and Nuralim, H. (2004). Ten-year radiographic outcome in patients with rheumatoid factor positive rheumatoid arthritis treated with aggressive immunosuppressive combination therapy. *The Journal of rheumatology Supplement* 69, 66-69.

De Rycke, L., Nicholas, A.P., Cantaert, T., Kruithof, E., Echols, J.D., Vandekerckhove, B., Veys, E.M., De Keyser, F., and Baeten, D. (2005). Synovial intracellular citrullinated proteins colocalizing with peptidyl arginine deiminase as pathophysiologically relevant antigenic determinants of rheumatoid arthritis-specific humoral autoimmunity. *Arthritis and rheumatism* 52, 2323-2330.

Deckers, N., Saerens, D., Kanobana, K., Conrath, K., Victor, B., Wernery, U., Vercruyse, J., Muyldermans, S., and Dorny, P. (2009). Nanobodies, a promising tool for species-specific diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis. *International journal for parasitology* 39, 625-633.

Elliott, M.J., Maini, R.N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., Bijl, H., and Woody, J.N. (1994). Repeated therapy with monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) in patients with rheumatoid arthritis. *Lancet* 344, 1125-1127.

Elliott, M.J., Maini, R.N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., Katsikis, P., Brennan, F.M., Walker, J., Bijl, H., Ghayeb, J., *et al.* (1993). Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis and rheumatism* 36, 1681-1690.

Fais, S., Capobianchi, M.R., Silvestri, M., Mercuri, F., Pallone, F., and Dianzani, F. (1994). Interferon expression in Crohn's disease patients: increased interferon-gamma and -alpha mRNA in the intestinal lamina propria mononuclear cells. *Journal of interferon research* 14, 235-238.

Fang, L., Adkins, B., Deyev, V., and Podack, E.R. (2008). Essential role of TNF receptor superfamily 25 (TNFRSF25) in the development of allergic lung inflammation. *The Journal of experimental medicine* 205, 1037-1048.

Feldmann, M., Brennan, F.M., and Maini, R.N. (1996a). Rheumatoid arthritis. *Cell* 85, 307-310.

Feldmann, M., Brennan, F.M., and Maini, R.N. (1996b). Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annual review of immunology* 14, 397-440.

Han, B., Moore, P.A., Wu, J., and Luo, H. (2007). Overexpression of human decoy receptor 3 in mice results in a systemic lupus erythematosus-like syndrome. *Arthritis and rheumatism* 56, 3748-3758.

Harmsen, M.M., and De Haard, H.J. (2007). Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Applied microbiology and biotechnology* 77, 13-22.

Hedl, M., and Abraham, C. (2014). A TNFSF15 disease-risk polymorphism increases pattern-recognition receptor-induced signaling through caspase-8-induced IL-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 13451-13456.

Heidemann, S.C., Chavez, V., Landers, C.J., Kucharzik, T., Prehn, J.L., and Targan, S.R. (2010). TL1A selectively enhances IL-12/IL-18-induced NK cell cytotoxicity against NK-resistant tumor targets. *Journal of clinical immunology* 30, 531-538.

Hennig, C., Rink, L., Fagin, U., Jabs, W.J., and Kirchner, H. (2000). The influence of naturally occurring heterophilic anti-immunoglobulin antibodies on direct measurement of serum proteins using sandwich ELISAs. *Journal of immunological methods* 235, 71-80.

Hou, W., Medynski, D., Wu, S., Lin, X., and Li, L.Y. (2005). VEGI-192, a new isoform of TNFSF15, specifically eliminates tumor vascular endothelial cells and suppresses tumor growth. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11, 5595-5602.

Jones, G.W., Stumhofer, J.S., Foster, T., Twohig, J.P., Hertzog, P., Topley, N., Williams, A.S., Hunter, C.A., Jenkins, B.J., Wang, E.C., *et al.* (2011). Naive and activated T cells display differential responsiveness to TL1A that affects Th17 generation, maintenance, and proliferation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25, 409-419.

Kamada, N., Hisamatsu, T., Honda, H., Kobayashi, T., Chinen, H., Takayama, T., Kitazume, M.T., Okamoto, S., Koganei, K., Sugita, A., *et al.* (2010). TL1A produced by lamina propria macrophages induces Th1 and Th17 immune responses in cooperation with IL-23 in patients with Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases* 16, 568-575.

Kang, Y.J., Kim, W.J., Bae, H.U., Kim, D.I., Park, Y.B., Park, J.E., Kwon, B.S., and Lee, W.H. (2005). Involvement of TL1A and DR3 in induction of pro-inflammatory cytokines and matrix metalloproteinase-9 in atherogenesis. *Cytokine* 29, 229-235.

Keffer, J., Probert, L., Cazlaris, H., Georgopoulos, S., Kaslaris, E., Kioussis, D., and Kollias, G. (1991). Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *The EMBO journal* 10, 4025-4031.

Kim, S., and Zhang, L. (2005). Identification of naturally secreted soluble form of TL1A, a TNF-like cytokine. *Journal of immunological methods* 298, 1-8.

Kitson, J., Raven, T., Jiang, Y.P., Goeddel, D.V., Giles, K.M., Pun, K.T., Grinham, C.J., Brown, R., and Farrow, S.N. (1996). A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. *Nature* 384, 372-375.

Kojouharoff, G., Hans, W., Obermeier, F., Mannel, D.N., Andus, T., Scholmerich, J., Gross, V., and Falk, W. (1997). Neutralization of tumour necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Clinical and experimental immunology* 107, 353-358.

Konsta, M., Bamias, G., Tektonidou, M.G., Christopoulos, P., Iliopoulos, A., and Sfikakis, P.P. (2013). Increased levels of soluble TNF-like cytokine 1A in ankylosing spondylitis. *Rheumatology* 52, 448-451.

Laurence, A., Tato, C.M., Davidson, T.S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R.B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., *et al.* (2007). Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 26, 371-381.

Lee, C.S., Hu, C.Y., Tsai, H.F., Wu, C.S., Hsieh, S.L., Liu, L.C., and Hsu, P.N. (2008). Elevated serum decoy receptor 3 with enhanced T cell activation in systemic lupus erythematosus. *Clinical and experimental immunology* 151, 383-390.

Li, L., Fu, L., Lu, Y., Wang, W., Liu, H., Li, F., and Chen, T. (2014a). TNF-like ligand 1A is associated with the pathogenesis of psoriasis vulgaris and contributes to IL-17 production in PBMCs. *Archives of dermatological research* 306, 927-932.

Li, M., Zhu, M., Zhang, C., Liu, X., and Wan, Y. (2014b). Uniform orientation of biotinylated nanobody as an affinity binder for detection of *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry1Ac toxin. *Toxins* 6, 3208-3222.

Lin, W.W., and Hsieh, S.L. (2011). Decoy receptor 3: a pleiotropic immunomodulator and biomarker for inflammatory diseases, autoimmune diseases and cancer. *Biochemical pharmacology* 81, 838-847.

Lindqvist, E., Eberhardt, K., Bendtzen, K., Heinegard, D., and Saxne, T. (2005). Prognostic laboratory markers of joint damage in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 64, 196-201.

Long, W.Y., Chen, L., Zhang, C.L., Nong, R.M., Lin, M.J., Zhan, L.L., and Lv, X.P. (2014). Association between NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in Chinese Zhuang patients. *World journal of gastroenterology* : WJG 20, 4737-4744.

Ma, L., Sun, Y., Kang, X., and Wan, Y. (2014). Development of nanobody-based flow injection chemiluminescence immunoassay for sensitive detection of human prealbumin. *Biosensors & bioelectronics* 61, 165-171.

Marsters, S.A., Sheridan, J.P., Donahue, C.J., Pitti, R.M., Gray, C.L., Goddard, A.D., Bauer, K.D., and Ashkenazi, A. (1996). Apo-3, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, contains a death domain and activates apoptosis and NF-kappa B. *Current biology* : CB 6, 1669-1676.

McLaren, J.E., Calder, C.J., McSharry, B.P., Sexton, K., Salter, R.C., Singh, N.N., Wilkinson, G.W., Wang, E.C., and Ramji, D.P. (2010). The TNF-like protein 1A-death receptor 3 pathway promotes macrophage foam cell formation in vitro. *Journal of immunology* 184, 5827-5834.

Meylan, F., Davidson, T.S., Kahle, E., Kinder, M., Acharya, K., Jankovic, D., Bundoc, V., Hodges, M., Shevach, E.M., Keane-Myers, A., *et al.* (2008). The TNF-family receptor DR3 is essential for diverse T cell-mediated inflammatory diseases. *Immunity* 29, 79-89.

Meylan, F., Richard, A.C., and Siegel, R.M. (2011). TL1A and DR3, a TNF family ligand-receptor pair that promotes lymphocyte costimulation, mucosal hyperplasia, and autoimmune inflammation. *Immunological reviews* 244, 188-196.

Michelsen, K.S., Thomas, L.S., Taylor, K.D., Yu, Q.T., Mei, L., Landers, C.J., Derkowski, C., McGovern, D.P., Rotter, J.I., and Targan, S.R. (2009). IBD-associated TL1A gene (TNFSF15) haplotypes determine increased expression of TL1A protein. *PloS one* 4, e4719.

Migone, T.S., Zhang, J., Luo, X., Zhuang, L., Chen, C., Hu, B., Hong, J.S., Perry, J.W., Chen, S.F., Zhou, J.X., *et al.* (2002). TL1A is a TNF-like ligand for DR3 and TR6/DcR3 and functions as a T cell costimulator. *Immunity* 16, 479-492.

Muyldermans, S. (2013). Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annual review of biochemistry* 82, 775-797.

Naito, Y., Takagi, T., Handa, O., Ishikawa, T., Nakagawa, S., Yamaguchi, T., Yoshida, N., Minami, M., Kita, M., Imanishi, J., *et al.* (2003). Enhanced intestinal inflammation induced by dextran sulfate sodium in tumor necrosis factor-alpha deficient mice. *Journal of gastroenterology and hepatology* 18, 560-569.

Papadakis, K.A., Prehn, J.L., Landers, C., Han, Q., Luo, X., Cha, S.C., Wei, P., and Targan, S.R. (2004). TL1A synergizes with IL-12 and IL-18 to enhance IFN-gamma production in human T cells and NK cells. *Journal of immunology* 172, 7002-7007.

Pappu, B.P., Borodovsky, A., Zheng, T.S., Yang, X., Wu, P., Dong, X., Weng, S., Browning, B., Scott, M.L., Ma, L., *et al.* (2008). TL1A-DR3 interaction regulates Th17 cell function and Th17-mediated autoimmune disease. *The Journal of experimental medicine* 205, 1049-1062.

Parronchi, P., Romagnani, P., Annunziato, F., Sampognaro, S., Becchio, A., Giannarini, L., Maggi, E., Pupilli, C., Tonelli, F., and Romagnani, S. (1997). Type 1 T-helper cell predominance and

interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *The American journal of pathology* 150, 823-832.

Peltekova, V.D., Wintle, R.F., Rubin, L.A., Amos, C.I., Huang, Q., Gu, X., Newman, B., Van Oene, M., Cescon, D., Greenberg, G., *et al.* (2004). Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nature genetics* 36, 471-475.

Popescu, C., Zofota, S., Bojinca, V., and Ionescu, R. (2013). The significance of rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in systemic lupus erythematosus. *Romanian journal of internal medicine = Revue roumaine de medecine interne* 51, 179-187.

Qin, T. (2011). Upregulation of DR3 expression in CD4(+) T cells promotes secretion of IL-17 in experimental autoimmune uveitis. *Molecular vision* 17, 3486-3493.

Rankin, E.C., Choy, E.H., Kassimos, D., Kingsley, G.H., Sopwith, A.M., Isenberg, D.A., and Panayi, G.S. (1995). The therapeutic effects of an engineered human anti-tumour necrosis factor alpha antibody (CDP571) in rheumatoid arthritis. *British journal of rheumatology* 34, 334-342.

Rossotti M., Pirez M., Majkova Z., Cui Y., Morisseau C., Leizagoyen C., Hammock B.D., and Gonzalez-Sapienza G. High-throughput affinity ranking of nanobodies and selection of pairs for the development of sensitive sandwich immunoassays using human epoxide hydrolase as model antigen. Manuscript in preparation.

Salem, M., Seidelin, J.B., Eickhardt, S., Alhede, M., Rogler, G., and Nielsen, O.H. (2015). Species-specific engagement of human nucleotide oligomerization domain 2 (NOD)2 and Toll-like receptor (TLR) signalling upon intracellular bacterial infection: role of Crohn's associated NOD2 gene variants. *Clinical and experimental immunology* 179, 426-434.

Screaton, G.R., Xu, X.N., Olsen, A.L., Cowper, A.E., Tan, R., McMichael, A.J., and Bell, J.I. (1997). LARD: a new lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative pre-mRNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 4615-4619.

Schreiber, T.H., Wolf, D., Tsai, M.S., Chirinos, J., Deyev, V.V., Gonzalez, L., Malek, T.R., Levy, R.B., and Podack, E.R. (2010). Therapeutic Treg expansion in mice by TNFRSF25 prevents allergic lung inflammation. *The Journal of clinical investigation* 120, 3629-3640.

Sewell, G.W., Rahman, F.Z., Levine, A.P., Jostins, L., Smith, P.J., Walker, A.P., Bloom, S.L., Segal, A.W., and Smith, A.M. (2012). Defective tumor necrosis factor release from Crohn's disease macrophages in response to Toll-like receptor activation: relationship to phenotype and genome-wide association susceptibility loci. *Inflammatory bowel diseases* 18, 2120-2127.

Shih, D.Q., Barrett, R., Zhang, X., Yeager, N., Koon, H.W., Phaosawasdi, P., Song, Y., Ko, B., Wong, M.H., Michelsen, K.S., *et al.* (2011). Constitutive TL1A (TNFSF15) expression on lymphoid or myeloid cells leads to mild intestinal inflammation and fibrosis. *PLoS one* 6, e16090.

Shrivastava A., Gupta V.B. (2011). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists* 2, 21-25.

Siakavellas, S.I., Sfikakis, P.P., and Bamias, G. (2015). The TL1A/DR3/DcR3 pathway in autoimmune rheumatic diseases. *Seminars in arthritis and rheumatism*.

Slebioda, T.J., and Kmiec, Z. (2014). Tumour necrosis factor superfamily members in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Mediators of inflammation* 2014, 325129.

Slebioda, T.J., Rowley, T.F., Ferdinand, J.R., Willoughby, J.E., Buchan, S.L., Taraban, V.Y., and Al-Shamkhani, A. (2011). Triggering of TNFRSF25 promotes CD8(+) T-cell responses and anti-tumor immunity. *European journal of immunology* 41, 2606-2611.

Solomon, D.H., Goodson, N.J., Katz, J.N., Weinblatt, M.E., Avorn, J., Setoguchi, S., Canning, C., and Schneeweiss, S. (2006). Patterns of cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 65, 1608-1612.

Somerville, K.W., Logan, R.F., Edmond, M., and Langman, M.J. (1984). Smoking and Crohn's disease. *British medical journal* 289, 954-956.

Song, L., Zhou, R., Huang, S., Zhou, F., Xu, S., Wang, W., Yi, F., Wang, X., and Xia, B. (2013). High intestinal and systemic levels of interleukin-23/T-helper 17 pathway in Chinese patients with inflammatory bowel disease. *Mediators of inflammation* 2013, 425915.

Stamatelopoulos, K., Georgiou, S., Kanakakis, I., Papamichael, C., Oikonomidis, N., Mantzou, A., Samouilidou, E., Loizos, S., Zakopoulos, N., and Sfrikakis, P.P. (2015). Circulating levels of TNF-like cytokine 1A correlate with reflected waves and atherosclerosis extent and may predict cardiac death in patients with stable coronary artery disease. *Cytokine* 72, 102-104.

Stoll, M., Corneliussen, B., Costello, C.M., Waetzig, G.H., Mellgard, B., Koch, W.A., Rosenstiel, P., Albrecht, M., Croucher, P.J., Seegert, D., *et al.* (2004). Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nature genetics* 36, 476-480.

Sun, X., Zhao, J., Liu, R., Jia, R., Sun, L., Li, X., and Li, Z. (2013). Elevated serum and synovial fluid TNF-like ligand 1A (TL1A) is associated with autoantibody production in patients with rheumatoid arthritis. *Scandinavian journal of rheumatology* 42, 97-101.

Tabares-da Rosa, S., Rossotti, M., Carleiza, C., Carrion, F., Pritsch, O., Ahn, K.C., Last, J.A., Hammock, B.D., and Gonzalez-Sapienza, G. (2011). Competitive selection from single domain antibody libraries allows isolation of high-affinity antihapten antibodies that are not favored in the llama immune response. *Analytical chemistry* 83, 7213-7220.

Takedatsu, H., Michelsen, K.S., Wei, B., Landers, C.J., Thomas, L.S., Dhall, D., Braun, J., and Targan, S.R. (2008). TL1A (TNFSF15) regulates the development of chronic colitis by modulating both T-helper 1 and T-helper 17 activation. *Gastroenterology* 135, 552-567.

Tan, K.B., Harrop, J., Reddy, M., Young, P., Terrett, J., Emery, J., Moore, G., and Truneh, A. (1997). Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Gene* 204, 35-46.

Taraban, V.Y., Ferdinand, J.R., and Al-Shamkhani, A. (2011a). Expression of TNFRSF25 on conventional T cells and Tregs. *The Journal of clinical investigation* 121, 463-464; author reply 465.

Taraban, V.Y., Slebioda, T.J., Willoughby, J.E., Buchan, S.L., James, S., Sheth, B., Smyth, N.R., Thomas, G.J., Wang, E.C., and Al-Shamkhani, A. (2011b). Sustained TL1A expression modulates effector and regulatory T-cell responses and drives intestinal goblet cell hyperplasia. *Mucosal immunology* 4, 186-196.

Tremelling, M., Berzuini, C., Massey, D., Bredin, F., Price, C., Dawson, C., Bingham, S.A., and Parkes, M. (2008). Contribution of TNFSF15 gene variants to Crohn's disease susceptibility confirmed in UK population. *Inflammatory bowel diseases* 14, 733-737.

Twohig, J.P., Marsden, M., Cuff, S.M., Ferdinand, J.R., Gallimore, A.M., Perks, W.V., Al-Shamkhani, A., Humphreys, I.R., and Wang, E.C. (2012). The death receptor 3/TL1A pathway is essential for efficient development of antiviral CD4(+) and CD8(+) T-cell immunity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26, 3575-3586.

van Venrooij, W.J., and Pruijn, G.J. (2000). Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis research* 2, 249-251.

Vanlandschoot, P., Stortelers, C., Beirnaert, E., Ibanez, L.I., Schepens, B., Depla, E., and Saelens, X. (2011). Nanobodies(R): new ammunition to battle viruses. *Antiviral research* 92, 389-407.

Vanrell, L., Gonzalez-Techera, A., Hammock, B.D., and Gonzalez-Sapienza, G. (2013). Nanopeptamers for the development of small-analyte lateral flow tests with a positive readout. *Analytical chemistry* 85, 1177-1182.

Vossenaar, E.R., and van Venrooij, W.J. (2004). Citrullinated proteins: sparks that may ignite the fire in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* 6, 107-111.

Wen, L., Zhuang, L., Luo, X., and Wei, P. (2003). TL1A-induced NF-kappaB activation and c-IAP2 production prevent DR3-mediated apoptosis in TF-1 cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 39251-39258.

Wesolowski, J., Alzogaray, V., Reyelt, J., Unger, M., Juarez, K., Urrutia, M., Cauherff, A., Danquah, W., Rissiek, B., Scheuplein, F., *et al.* (2009). Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Medical microbiology and immunology* 198, 157-174.

Westwood, O.M., Nelson, P.N., and Hay, F.C. (2006). Rheumatoid factors: what's new? *Rheumatology* 45, 379-385.

William, J., Euler, C., Christensen, S., and Shlomchik, M.J. (2002). Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers. *Science* 297, 2066-2070.

Xiong, G., Guo, H., Wang, K., Hu, H., Wang, D., Xu, X., Guan, X., Yang, K., and Bai, Y. (2010). Polymorphisms of decoy receptor 3 are associated with risk of esophageal squamous cell carcinoma in Chinese Han. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 31, 443-449.

Xiu, Z., Shen, H., Tian, Y., Xia, L., and Lu, J. (2015). Serum and synovial fluid levels of tumor necrosis factor-like ligand 1A and decoy receptor 3 in rheumatoid arthritis. *Cytokine* 72, 185-189.

Yamazaki, K., McGovern, D., Ragoussis, J., Paolucci, M., Butler, H., Jewell, D., Cardon, L., Takazoe, M., Tanaka, T., Ichimori, T., *et al.* (2005). Single nucleotide polymorphisms in TNFSF15 confer susceptibility to Crohn's disease. *Human molecular genetics* 14, 3499-3506.

Zhan, C., Yan, Q., Patskovsky, Y., Li, Z., Toro, R., Meyer, A., Cheng, H., Brenowitz, M., Nathenson, S.G., and Almo, S.C. (2009). Biochemical and structural characterization of the human TL1A ectodomain. *Biochemistry* 48, 7636-7645.

Zhang, J., Wang, X., Fahmi, H., Wojcik, S., Fikes, J., Yu, Y., Wu, J., and Luo, H. (2009). Role of TL1A in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Journal of immunology* 183, 5350-5357.

Zhou, M., Liu, R., Su, D., Feng, X., and Li, X. (2014). TL1A increased the differentiation of peripheral Th17 in rheumatoid arthritis. *Cytokine* 69, 125-130.

Zhu, M., Gong, X., Hu, Y., Ou, W., and Wan, Y. (2014). Streptavidin-biotin-based directional double Nanobody sandwich ELISA for clinical rapid and sensitive detection of influenza H5N1. *Journal of translational medicine* 12, 352.