



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

Departamento de Química

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ÁREA DE TOXICOLOGÍA

TESIS

Estudio del efecto biológico de la proteína recombinante SA-F3X-BBL sobre células presentadoras de antígeno mediante ensayos *in vitro*

PRESENTA

Bertha Alicia Hernández Mercado

TUTORES

Dra. Eva María Salinas Miralles

Dr. Daniel Cervantes García

Dra. Raquel Guerrero Alba

Aguascalientes, Ags. Fecha: 18 de Junio de 2021



UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES

CARTA DE VOTO APROBATORIO
COMITÉ TUTORAL

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **BERTHA ALICIA HERNÁNDEZ MERCADO** con ID 140799 quien realizó *la tesis* titulada: **PRODUCCIÓN Y EFECTO BIOLÓGICO DE UNA PROTEÍNA RECOMBINANTE DEL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO FUSIONADA A UN COESTIMULADOR PARA SER APLICADA COMO VACUNA**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que *ella* pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 11 de junio de 2021

Dra. Eva María Salinas Miralles
Tutora de tesis

Dr. Daniel Cervantes García
Tutor de tesis

Dra. Raquel Guerrero Alba
Asesora de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SE-FO-16
Actualización: 00
Emisión: 17/05/19



DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 15/06/21

NOMBRE: Bertha Alicia Hernández Mercado **ID** 140799
PROGRAMA: Maestría en Ciencias Áreas: Biotecnología vegetal o Toxicología **LGAC (del posgrado):** Toxicología
TIPO DE TRABAJO: Tesis Trabajo práctico

TÍTULO: Estudio del efecto biológico de la proteína recombinante SA-F3X-B6L sobre células presentadoras de antígeno mediante ensayos in vitro
Se desarrollaron estudios preclínicos de un prototipo de vacuna para el Virus Sincitial Respiratorio

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): Sincitial Respiratorio

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- SI El trabajo es congruente con los LGAC del programa de posgrado
- SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
- SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
- SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
- SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
- SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
- SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
- C Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
- SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
- SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutoral, en caso de los posgrados profesionales el tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
- NA Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
- NA Coincide con el título y objetivo registrado
- SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
- SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
- NA Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- NA Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
- NA El estudiante es el primer autor
- NA El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
- NA En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
- NA Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
- NA La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado SI X
No

FIRMAS

Elsa Marcela Ramirez Lopez
Dra. en C. Elsa Marcela Ramirez Lopez

Dra. en C. Tatiana Guerrero Alba
Dra. en C. Tatiana Guerrero Alba

Dra. en C. Haydee Martinez-Ruvalcaba
Dra. en C. Haydee Martinez-Ruvalcaba

M. en C. Jorge Martin Alvarez Chavez
M. en C. Jorge Martin Alvarez Chavez

Elaboró:
* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

Revisó:
NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

Autorizó:
NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado
 Se cumplió con el Art. 165C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 309 F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

Elaborado por: D. Apoyo al Posg.
 Revisado por: D. Control Escolar/D. Gestión de Calidad.
 Aprobado por: D. Control Escolar/ D. Apoyo al Posg.

código: 040-50-0-10-25
 Versión: 05
 Emisión: 26/06/20

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes por tenerme una vez más como su alumna para terminar de formarme como investigadora.

A Conacyt por el apoyo de la beca de maestría en el periodo 2018-2020.

A mi tutora, la Dra. Eva María Salinas Miralles por permitirme una vez más participar en su laboratorio, ahora como alumna de posgrado. Gracias por la confianza y todas las palabras bonitas que me ha dedicado por mi labor en el laboratorio. Esto me ha reforzando mis deseos de dedicarme a la investigación.

A mi tutor, el Dr. Daniel Cervantes García que igualmente me recibió de nuevo en su tutela y en un proyecto propio, el cual superó mis expectativas de aprendizaje y crecimiento. Gracias por creer en mi una vez más.

A la Dra. Raquel Guerrero Alba por su apoyo a esta investigación, sus palabras de apoyo y el tiempo invertido en esta tesis.

A la Dr. Laura Elena Córdova Dávalos que fue una de las guías más importantes para mi a nivel técnico y personal. Sin ella no hubiera podido terminar mis western blots.

A mi compañera de tesis y amiga Berenice Barrón, que juntas nos embarcamos a aprender cosas nuevas, y sin su apoyo, enseñanzas, compañía y aventuras no hubiera terminado esta tesis.

A las otras dos chicas del pasillo Pamela Gallegos y Diana Reyes, que estuvieron ahí para dar apoyo moral y técnico desde que fui instructor beca hasta el término de mi maestría, creando un equipo fantástico en el laboratorio.

A la Dra. Mariela Vargas que desde la Licenciatura me inculcó el amor por la inmunología.

Y por último a mi esposo Alfredo Luna Galicia, que incondicionalmente me apoyo durante toda esta aventura llamada posgrado. Sin él, nada de esto hubiera sido posible.

DEDICATORIAS

A mi esposo Alfredo Luna Galicia, el cual me ha visto crecer y superarme desde la preparatoria, y que a mitad del posgrado se casó conmigo y me apoyó incondicionalmente: en cada ensayo largo, cada desvelada escribiendo la tesis, cada presentación en la cual el me escuchaba atentamente y en cada momento de desesperación en el cual pensaba que no lo lograría y me animaba a seguir adelante una vez más. Gracias por compartir mi amor por la ciencia.



Una lección sin dolor no tiene sentido. Eso es porque no se puede ganar algo sin sacrificar algo a cambio. Sin embargo, una vez que hayas soportado el dolor y lo hayas superado, ganarás un corazón que es más fuerte que todo lo demás. Así es, un corazón de acero – Hiromu Arakawa

ÍNDICE

CAPÍTULO I ANTECEDENTES	11
1. Sistema inmune	12
1.1 Células presentadoras de antígeno	13
1.1-1 Macrófagos y subpoblaciones	17
1.2 Virus Sincitial Respiratorio.....	21
1.2-1 Infección por RSV y características clínicas	26
1.2-2 Respuesta del hospedero a la infección	27
1.2-3 Profilaxis en la infección por el RSV	32
1.3 Co-estimuladores en la presentación de antígeno	34
1.3-1 El señalosoma 4-1BB/4-1BBL.....	35
1.4 La proteína recombinante SA-4-1BBL	39
1.5 Sistemas de expresión procariontes	41
CAPÍTULO II JUSTIFICACIÓN	45
2. JUSTIFICACIÓN.....	46
CAPÍTULO III	47
HIPÓTESIS.....	47
3. HIPÓTESIS.....	48
CAPÍTULO IV OBJETIVOS.....	49
4. OBJETIVO GENERAL.....	50
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	50
CAPÍTULO V METODOLOGÍA	51
5. METODOLOGÍA	52
5.1 Purificación de la proteína.....	52
5.1-1 Extracción del plásmido.....	52
5.1-2 Transformación de <i>E. coli</i> C43	52
5.1-3 Inducción de producción de las proteínas SA-F3X-BBL	53
5.1-4 Extracción y purificación de las proteínas SA-BBL y SA-F3X-BBL.....	54
5.1-5 Identificación de la proteína SA-BBL y SA-F3X-BBL.....	54
5.2 Establecimiento de la línea celular RAW 264.7	57
5.2-1 Activación de RAW 264.7 con LPS y reacción de Griess	57

5.3 Prueba de MTT	58
5.4 Respuesta de células RAW 264.7 en presencia de la proteína SA-F3X-BBL	58
5.4-1 Obtención de proteína total y fracción microsomal de RAW. 264.7	59
5.4-2 Evaluación de las vías de señalización.....	59
5.4-3 Extracción de RNA y síntesis cDNA	61
5.4-4 PCR punto final y tiempo real.....	61
5-5- Análisis estadístico.....	62
CAPÍTULO VI RESULTADOS.....	63
6.1 Producción de la proteína recombinante	64
6.2 Establecimiento de la línea celular RAW 264.7	66
6.2-1 Activación de células RAW 264.7	66
6.3 Evaluación de la toxicidad de la proteína SA-F3X-BBL en células RAW 264.7	67
6.4 Efecto biológico de la proteína SA-F3X-BBL en células RAW 264.7	69
6.4-1. Proteínas de la vía de señalización	69
6.3-3. Inducción de la expresión genética en macrófagos RAW 264.7	73
CAPÍTULO VII DISCUSIÓN	80
CAPÍTULO VIII CONCLUSIONES.....	89
CAPÍTULO IX BIBLIOGRAFÍA.....	91



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos de la vía de señalización y sus características.	60
Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.....	62



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Interacciones entre las células T y las DCs y las tres señales que llevan a la activación y expansión de células T.....	15
Figura 2. Moléculas asociadas con las subpoblaciones de los macrófagos.....	20
Figura 3. Esquema del Virus Sincitial Respiratorio	21
Figura 4. Mapa del RNA genómico viral.	22
Figura 5. Proteínas del RSV: funciones y localización en el virón	24
Figura 6. Diagrama de la estructura primaria de la proteína F.....	25
Figura 7. Mecanismos de defensa del hospedero contra la infección de RSV.	28
Figura 8. Activación de linfocito T	36
Figura 9. Ruta putativa de señalización para la activación de 4-1BB dependiente de TRAF	39
Figura 10. Estructura molecular de la proteína recombinante SA-4-1BBL.....	40
Figura 11. Estructura general de un vector de expresión bacteriano	42
Figura 12. Esquema de la proteína recombinante SA-F3X-4-1BB en el plásmido y linearizada	44
Figura 13. Gráfica de curva patrón de albúmina	55
Figura 14 Modelo experimental para la producción e identificación de la proteína recombinante.....	56
Figura 15. Curva patrón de NO ²	58
Figura 16. Electroforesis de la PCR de E. coli C43 transformadas con el vector de expresión pET6xHN-SA-4-1BBL.....	64
Figura 17. Fracción soluble purificada de los cultivos de E. coli expresando la proteína SA-F3X-BBL a las 24 h de inducción.....	65
Figura 18. Reacción de Griess de la incubación de RAW 264.7 con LPS.	67
Fig. 19 Porcentaje de supervivencia de células Raw 264.7 con diferentes concentraciones de SA-F3X-BBL.	69

Figura 20. Expresión relativa de 4-1BB en la línea celular RAW 264.7 a diferentes concentraciones de SA-F3X-BBL. 70

Figura 21. Expresión relativa de la proteína TRAF2 en células RAW 264.7 a diferentes concentraciones de SA-F3X-BBL. 71

Figura 22. Expresión relativa del p-p38 en células RAW 264.7 a diferentes concentraciones de SA-F3X-BBL. 72

Figura 23. Expresión relativa del p-IkB en células RAW 264.7 a diferentes concentraciones de SA-F3X-BBL. 73

Figura 24. Expresión relativa del gen 4-1BB en células RAW 264.7 a diferentes concentraciones de SA-F3X-BBL 74

Figura 25. Expresión relativa del gen de 4-1BBL en células RAW 264.7 a diferentes concentraciones de SA-F3X-BBL 75

Figura 26. Expresión relativa del gen TNF- α en células RAW 264.7 a diferentes concentraciones de SA-F3X-BBL. 76

Figura 27. Expresión relativa del gen de IFN- γ en células RAW 264.7 a diferentes concentraciones de SA-F3X-BBL 77

Figura 28. Expresión relativa del gen de IL-12 en células RAW 264.7 a diferentes concentraciones de SA-F3X-BBL. 78

Figura 29. Expresión relativa del gen BIRC5 en células RAW 264.7 a diferentes concentraciones de SA-F3X-BBL. 79

Figura 30. Expresión relativa del gen Bcl2l11 en células RAW 264.7 a diferentes concentraciones de SA-F3X-BBL. 79

ACRÓNIMOS

<i>Amp</i>	Ampicilina
<i>CD</i>	Cluster de diferenciación
<i>DC</i>	Células dendríticas
<i>ERK</i>	Cinasa regulada por señal extracelular
<i>IFN</i>	Interferón
<i>Ig</i>	Inmunoglobulina
<i>IL</i>	Interleucina
<i>IPTG</i>	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
<i>LCT</i>	Linfocitos T citotóxicos
<i>MAPK</i>	Proteína cinasas activadas por mitógenos
<i>MHC</i>	Complejo principal de histocompatibilidad
<i>MTT</i>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
<i>NF-κB</i>	Factor nuclear asociado a la cadena κ de linfocitos B
<i>nm</i>	Nanómetros
<i>PAMPs</i>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<i>PRRs</i>	Receptores de reconocimiento de patrones
<i>RNA</i>	Ácido ribonucleico
<i>RSV</i>	Virus Sincitial Respiratorio
<i>TNF</i>	Factor de necrosis tumoral
<i>TA</i>	Temperatura ambiente
<i>TCR</i>	Receptor de células T
<i>Th-</i>	Linfocito T cooperador
<i>TLRs</i>	Receptores tipo Toll
<i>TNFR</i>	Receptor del factor de necrosis tumoral
<i>TRAF</i>	Factor asociado al receptor de factor de necrosis tumoral
<i>SFB</i>	Suero bovino fetal
<i>IPTG</i>	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
<i>TNFR/L</i>	Familia del factor de necrosis tumoral Receptor/Ligando

RESUMEN

El virus sincitial respiratorio (RSV) es la etiología más importante de las infecciones respiratorias agudas, en particular bronquiolitis, en niños menores a 5 años. Los tratamientos actuales son costosos, algunos casos requieren hospitalización y no hay vacuna disponible. Una característica importante dentro de su fisiopatología es la generación de una respuesta inmune tipo 2 que favorece la agresividad de la infección. Una posible estrategia profiláctica, además de la estimulación con un antígeno, es el uso de coestimuladores que permitan generar un balance hacia una respuesta inmune tipo 1, ya que se sabe es la que permite una mejor eliminación del RSV. Este trabajo tuvo como objetivo generar una proteína recombinante conformada por la proteína F del RSV, fusionada a un coestimulador para observar su efecto biológico en un modelo *in vitro*. Se transformaron bacterias *Escherichia coli* C43 con un vector de expresión procarionte con cuatro elementos: una secuencia que codifica para 6 histidinas para la purificación de la proteína, la secuencia del core de la estreptavidina, la secuencia del sitio II inmunogénico de la proteína F en un tándem de 3 y el coestimulador 4-1BBL de respuesta inmune tipo 1 (pET-6xHN-SA-F3X-4-1BBL). La producción de SA-F3X-BBL fue inducida con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido 1 mM por 24h, purificada en columnas de níquel e identificada por western blot. Las células presentadores de antígeno RAW 264.7 se estimularon a diferentes concentraciones de proteína recombinante a las 24 y 48h, para analizar la activación del señalosoma 4-1BB/4-1BBL por western blot y qPCR. SA-F3X-BBL se purificó de la fracción soluble con un rendimiento de 5.6% con un peso molecular de 84.4 kDa. SA-F3X-BBL logró reclutar proteínas TRAF2 a partir de la estimulación con 4-1BBL, activando las vías de señalización p38 MAPK y NF- κ B, produciendo río abajo IFN- γ , TNF- α y BIRC5 principalmente por medio de p38 MAPK.

ABSTRACT

Respiratory syncytial virus (RSV) is the most important etiology of acute respiratory infections, mainly bronchiolitis, in children under 5 years old. RSV current treatments are expensive, and in some cases, hospitalization is required. Furthermore, there's no vaccine available. An important characteristic within its pathophysiology is the generation of a type 2 immune response that favors the aggressiveness of the RSV infection. A possible prophylactic strategy, in addition to stimulation with an antigen, is the use of immune system costimulatory molecules that induces a skew towards a type 1 immune response, since it is known that it is the most adequate to viral clearance. In this work, we aimed to generate a recombinant protein with RSV F protein, fused with a costimulatory molecule, to observe its biological effect *in vitro*. C43 *Escherichia coli* cells were transformed with a prokaryote expression vector integrated by four elements: a histidine tail for protein purification, the sequence of core streptavidin, three repetitions of F protein immunogenic site II in tandem, and the immune response type-1 costimulatory molecule 4-1BBL (pET-6xHN-SA-F3X-4-1BBL). The production of SA-F3X-BBL was induced with 1 mM Isopropyl- β -D-thiogalactoside for 24h, purified with nickel columns and identified by western blot. Antigen presenting cells RAW 264.7 were stimulated with different recombinant protein concentrations at 24 and 48h, and western blot and qPCR were used to evaluate the activation of the 4-1BB / 4-1BBL signalosome. The recombinant protein was purified from the soluble fraction with a 5.6% yield and an 84.4 kDa molecular weight. SA-F3X-BBL succeeded in TRAF2 proteins recruitment from 4-1BBL stimulation, activation of p38 MAPK and NF- κ B signaling pathways resulting in IFN- γ , TNF- α and BIRC5 downstream production, mainly through p38 MAPK.

INTRODUCCIÓN

El virus sincitial respiratorio (RSV), a pesar de ser uno de los principales causantes de hospitalizaciones y muertes en infantes, no tiene una vacuna aprobada hasta el día de hoy. En 1960, se desarrolló una vacuna inactivada con formalina (FI-RSV), la cual resultó en aumento de la enfermedad respiratoria asociada a la vacuna tras una infección natural con el RSV. Este evento, además de la poca información y tecnologías que se tenían en ese momento, causó un bloqueo en el desarrollo de otras alternativas. Gracias a la descripción de la estructura de la proteína F, junto al desarrollo de nuevas estrategias de vacunas que involucran a la biotecnología moderna, han permitido el diseño de vacunas utilizando regiones inmunodominantes de las proteínas virales que generan una respuesta inmune más robusta y memoria a largo plazo. En este proyecto se utilizó un vector de expresión procarionte, el cual posee la secuencia del monómero de estreptavidina, la cual es una región de tetramerización para aumentar la señalización. También posee un antígeno inmunodominante del sitio II de la proteína F, así como un adyuvante para la co-estimulación de células del sistema inmune perteneciente a la familia del factor de necrosis tumoral Receptor/Ligando (TNFR/L) llamada 4-1BBL. Bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) de la cepa C43 se transformaron con este vector de expresión, el cual fue inducido con Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1mM para producir la proteína recombinante SA-F3X-BBL. La proteína recombinante fue extraída y purificada de su fracción soluble. Para probar su efecto biológico se utilizó un modelo *in vitro* de células presentadoras de antígeno (CPA), la línea celular RAW 264.7, las cuales se sometieron a pruebas de supervivencia celular con diferentes concentraciones de la proteína recombinante. El efecto biológico fue evaluado analizando la expresión proteica y genética del receptor de 4-BBL, proteínas que activan vías de señalización (TRAF) relacionadas con las vías de las proteínas cinasas activada por mitógenos (MAPK) y el factor nuclear asociado a la cadena κ de linfocitos B NF- κ B, además de citocinas (TNF- α , IFN- γ) y proteínas de supervivencia celular (BIRC5 y Bcl2l11) involucradas en estas mismas vías celulares.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES



1. Sistema inmune

El sistema inmune es un conjunto de células, tejidos y órganos que trabajan colectivamente dentro del organismo para protegerlo de microorganismos, así como de moléculas, que son reconocidos como extraños. Las células de los sistemas inmunitarios innato y adaptativo están presentes en forma de células circulantes en la sangre y en la linfa, en órganos linfáticos y en forma de células dispersas en casi todos los tejidos.

Las primeras barreras de defensa que se enfrentan a los factores externos para entrar al organismo no son específicas y pueden ser físicas, químicas o biológicas como las barreras anatómicas y algunas son sistémicas como la temperatura (Collado y col., 2008). A este conjunto de defensas contra agentes extraños se le llama inmunidad innata y actúa en las primeras horas o días de la infección. Los receptores microbianos de la inmunidad innata o receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) son específicos frente a estructuras que son comunes a grupos de microbios relacionados, conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), y no distinguen las sutiles diferencias que hay entre ellos (Medzhitov y Janeway, 1997). Entre los PRRs se encuentran los receptores tipo Toll (TLR), los cuales tienen la capacidad de reconocer a un número determinado de ligandos en bacterias, hongos, protozoos y virus (Chuang y Ulevitch, 2000; Campos y col., 2001; Alexopoulou y col., 2001). Los principales componentes de la inmunidad innata son: barreras físicas (epitelio y mucosas) y químicas (sustancias antimicrobianas), células fagocíticas como los neutrófilos y macrófagos, células dendríticas (DC), mastocitos, células linfoides innatas como los linfocitos “natural killer” (NK), los linfocitos NK-T y $T\gamma\delta$ (Whiteside, 2001a y 2001b; Beetz y col., 2008) y proteínas sanguíneas, incluidos miembros del sistema de complemento y otros mediadores de la inflamación. Los mecanismos principales de la inmunidad innata son el reclutamiento de leucocitos fagocitarios para la destrucción del patógeno, proceso que forma parte de la inflamación, el bloqueo de la replicación de los virus o la muerte de las células infectadas (Collado y col., 2008)

Las células que fagocitan y destruyen patógenos se han adaptado para funcionar mejor en combinación con el sistema inmune adaptativo. La respuesta inmunitaria adaptativa está mediada por los linfocitos T, B y sus productos (Beutler, 2004). Los linfocitos poseen receptores de superficie como el receptor de linfocitos T (TCR) o anticuerpos (en linfocitos B), los cuales reconocen antígenos con una alta especificidad y diversidad (Gearhart, 2004). Dentro de la inmunidad adquirida hay dos tipos de respuestas inmunitarias, la humoral y celular, en las cuales intervienen componentes diferentes del sistema inmunitario y que

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

sirven para eliminar diferentes tipos de patógenos. La inmunidad humoral es ejercida por los anticuerpos producidos por los linfocitos B. Los anticuerpos reconocen los antígenos microbianos, neutralizan la infección y los marcan para que los fagocitos los eliminen (Vinuesa y col., 2005).

La inmunidad celular es ejercida por los linfocitos T, los cuales fomentan la destrucción de los microorganismos dentro de los fagocitos o de las células infectadas por microbios, como virus y a los cuales los anticuerpos no son accesibles. La inmunidad adaptativa también se caracteriza por la capacidad de reconocer de nuevo a un mismo antígeno. La memoria inmunitaria se debe a que cada exposición a un antígeno genera células de memoria de vida larga específicas frente a un antígeno (Mueller y col., 2013).

Por último, el sistema adaptativo tiene un mecanismo de tolerancia para que este no reaccione a sustancias antigénicas propias y se conserva por diferentes mecanismos. Entre ellos está la eliminación de linfocitos autorreactivos o la supresión de estas células por las acciones de las células T reguladoras (T_{reg}) (Bluestone, 2011).

1.1 Células presentadoras de antígeno

Las células presentadoras de antígeno (CPA) actúan como un puente entre la respuesta inmune innata y adaptativa (Banchereau y Steinman, 1998). Las CPA pueden mostrar el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I y II en la membrana junto con las señales de co-estimulación para activar células T específicas de antígeno, las cuales juegan un papel importante en la respuesta adaptativa (Banchereau y Palucka, 2005). Los linfocitos B, los macrófagos y las DCs son responsables de la inducción de la respuesta inmune celular, por medio de la internalización de los antígenos para la presentación a las células T. De todas las CPA, las DC son las más efectivas para inducir la inmunidad (Banchereau y Steinman, 1998). Además, también son de rápida activación en respuesta a antígenos de origen viral o bacteriano.

Las DC se originan del precursor mieloide, que durante su desarrollo se mueven de la sangre periférica a los tejidos. Estas DC que residen en los tejidos (células inmaduras iDCs) tienen receptores especializados, como los receptores tipo Toll (TLR) que les permiten reconocer y responder de forma eficiente a los patógenos a través de sus PAMPs (Sallusto y col., 2000; De Vries y col., 2003). También tienen receptores de lectinas tipo C y para las fracciones cristalizables (Fc) de los anticuerpos que les permiten la internalización y

procesamiento de antígenos. Cuando las iDCs se exponen a patógenos, antígenos o señales proinflamatorias, entran en un proceso de maduración. Durante la maduración las DC aumentan los niveles de expresión de las moléculas del MHC y moléculas coestimuladoras, activan los mecanismos de procesamiento de antígenos y su migración es mayor, lo que les permite viajar a los nódulos linfáticos, donde interactúan con células T para iniciar la respuesta inmune adquirida (Gunzer y col., 2000; West y col., 2004; van Helden y col., 2006).

Las CPA requieren de tres señales para la activación de las células T. La primera señal es la unión de complejos de péptido-MHC para proporcionar especificidad al TCR. Los agonistas del TCR, como los complejos de péptido-MHC recombinante o los anticuerpos dirigidos hacia el cluster de diferenciación (CD)3, conducen a la ligación del TCR, lo cual provoca la activación de la célula T. La segunda señal es dada por moléculas coestimuladoras, que están reguladas por la unión de CD80/CD86 en las CPA a CD28 en la célula T; lo que conduce a la activación de las células T (Fig. 1). Por último, la tercera señal involucra citocinas producidas por las CPA o las células T, lo cual permite la diferenciación y expansión de estas (Pollizzi y Powell, 2014).

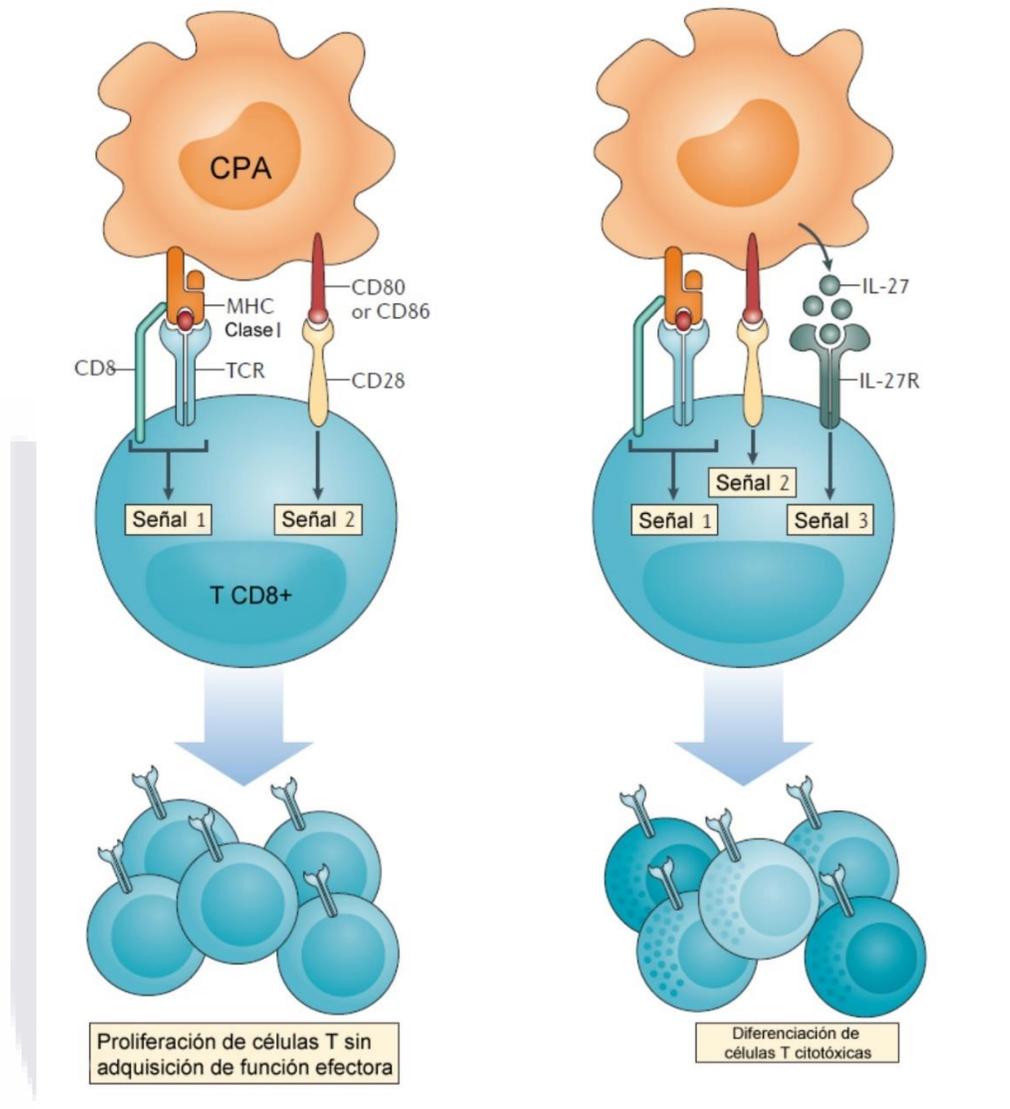


Figura 1. Interacciones entre las células T y las DCs y las tres señales que llevan a la activación y expansión de células T. Las células presentadoras de antígeno transmiten tres señales a las células T vírgenes para promover la activación, expansión clonal y la adquisición de las funciones efectoras. La señal 1 está dada por la activación del TCR por medio del péptido unido al MHC. La segunda señal es dada por moléculas co-estimuladoras, como la CD80 y CD86; y la tercera señal se da por los mediadores derivados de las CPA como la interleucina (IL)-27, que juega un papel importante en la diferenciación de linfocitos TCD8. Las CPA que sólo presentan la primera y segunda señal promueven la proliferación de las células T, pero no se diferencia en células efectoras. Las tres señales necesitan venir de la misma CPA para poder inducir la diferenciación de células T efectoras (T_{eff}). Los monocitos y macrófagos parecen adquirir las mismas propiedades de las DC para promover la activación de células T, expansión clonal y su diferenciación a células efectoras (Jakubzick y cols 2017).

Las líneas celulares RAW 264.7 y J774 son macrófagos derivados de tumores de la cepa BALB/c de ratón ampliamente utilizados para estudios *in vitro* (Ralph y Nakoinz, 1975; Raschke y col., 1978). Aunque la presentación de antígeno no sea tan eficiente en los macrófagos, estos tienen similitudes significativas con las DC en la respuesta a patógenos o antígenos. Estas líneas celulares de macrófagos expresan moléculas co-estimuladoras y del MHC de clase I y II (Saxena y col., 2003; Lee y col., 2004). La línea celular RAW 264.7 aumenta de forma eficiente la expresión en superficie de los co-estimuladores CD80, CD86, CD40 y el MHC de clase II en respuesta a lipopolisacáridos (LPS) (Lee y col., 2004). Además, con la estimulación con interleucina (IL)-4 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) por 7 días aumenta la expresión del CD11c, un marcador específico de superficie de DC en ratón (Van Helden y col., 2006). La línea celular J774 presenta un comportamiento similar, excepto porque no expresa CD11c (O'Farrell y col., 1988; Zur Lage y col., 2003). Otra línea celular muy utilizada como CPA es la de células dendríticas de ratón D1 (célula dendrítica inmadura), la cual es dependiente de factores de crecimiento y derivada de células de bazo de la cepa de ratón C57BL/6 (Winzler y col., 1997). Incluso, sin la estimulación de citocinas, estas son muy similares a las iDCs de ratón, basándose en la expresión de marcadores específicos, así como las moléculas co-estimuladoras CD80, CD86, CD40 y CD11c y del MHC de clase I y II. La línea celular D1 adquiere el fenotipo de maduración hasta un estímulo inflamatorio (Winzler y col., 1997).

Tanto las líneas celulares RAW 264.7 y J774 capturan a los antígenos por medio de fagocitosis y pinocitosis de manera muy eficiente, como lo hacen las iDCs en su proceso de maduración (Suram y col., 2006; Webster, 2002). Además, liberan citocinas como IL-6, factor de necrosis tumoral (TNF)- α , IL-1 β e IL-12 (Akhane y col., 1994; Briend y col., 1995; Agelaki y col., 2002), en respuesta al LPS. La línea celular D1 también captura eficientemente a los antígenos por fase fluida, así como por medio de endocitosis mediada por receptores (Sallusto y col., 1995). Al madurar estas producen IL-12p75 en respuesta al TNF- α y estimulan de forma eficiente a las células T (Winzler y col., 1997). También presentan antígenos por medio del MHC de clase I, un mecanismo llamado presentación cruzada que es esencial para la inducción de células T citotóxicas (Singh-Jasuja y col., 2000).

1.1-1 Macrófagos y subpoblaciones

Los monocitos son considerados los precursores de las células del sistema mononuclear fagocítico, que incluye monocitos, macrófagos y DC. Sin embargo, la población de DC también se origina directamente del precursor de DC (Collin y col., 2013).

Los monocitos que tienen la capacidad de presentar antígeno se les clasifica como DC derivados de monocitos (monocitos LY6C+). Estos son tan abundantes como las DC en los nódulos linfáticos de drenaje, tanto en ratón como en humanos (Jakubzick y col., 2013; Desch y col., 2016) y al ser estimulados, no solo se caracterizan por la expresión de moléculas del MHC de clase II y de CD11c, si no, por sus capacidades similares a las DC (Jakubzick y col., 2017). Se ha demostrado que los monocitos LY6C+ se convierten en las CPA dominantes en los nódulos linfáticos por inducción de la inmunidad mediada por el perfil Th1 durante la infección de virus por influenza (Kim y Braciale, 2009). Kim y Braciale (2009) muestran que los monocitos que presentaron el antígeno viral promovieron la proliferación de células T CD4+ específicas del antígeno. Nakano y colaboradores (2009) demostraron que los monocitos LY6C+ indujeron una respuesta mayor a la respuesta Th1 contra un antígeno viral, comparado con las CDs CD8+, además de aumentar la producción de IL-12p70. En otro estudio, con un modelo de inflamación inducido por el adyuvante Imject (mezcla de hidróxido de aluminio e hidróxido de magnesio), se observó un gran reclutamiento de monocitos, migración de monocitos a los nódulos linfáticos y presentación de antígeno a células T CD4+ (Langlet y col., 2012). Estos, como otros estudios (Leon y col., 2007; Flores-Langarica y col., 2011), han demostrado que los monocitos LY6C+ pueden procesar antígenos, migrar a los nódulos linfáticos y promover directamente al perfil Th1 (Jakubzick y col., 2017). Los monocitos LY6C+ también se han asociado con la maduración y producción de anticuerpos por los linfocitos B. Se demostró que monocitos estimulados con TLR9 de forma directa, realizaban la presentación de antígeno e inducían la diferenciación de linfocitos T cooperadores foliculares (Tfh) por medio de la producción de IL-6 (Fillatreau, 2014; Chakarov y Fazilleau, 2014). Otro estudio sugirió que en ausencia de DCs, los monocitos LY6C+ junto con los linfocitos B indujeron al desarrollo de las células Tfh a altas dosis de antígeno (Dahlgren y col., 2015). Esto se atribuye parcialmente a la localización anatómica de los monocitos en los nódulos linfáticos (regiones interfolicular y paracortical) (Jakubzick y col., 2017).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Los monocitos, tras ser reclutados desde la médula ósea a la circulación, migran a varios tejidos en el cuerpo y subsecuentemente se diferencian en macrófagos con sus propias características fenotípicas y funcionales de forma dependiente al tejido. Según el tipo de tejido en el que se encuentren, adoptan diferentes nombres, como los macrófagos alveolares en pulmón, microglía en el sistema nervioso central, y células de Kupffer en el hígado (Chávez y col., 2015).

En el 2000, Mills y colaboradores propusieron la terminología de M1 y M2 para las diferentes expresiones genéticas que tenían dos subpoblaciones de macrófagos. Utilizaron linfocitos T de dos líneas de ratones, uno que produce principalmente interferón (IFN)- γ , lo cual activa a los macrófagos para generar óxido nítrico (NO) a partir de la arginina y, por otro lado, ratones con linfocitos T que producen IL-4 y el factor transformante del crecimiento (TGF)- β 1, y generando ornitina de arginina por la acción de la arginasa. Finalmente demostraron que, en cada línea de ratón, sus macrófagos expresaban diferentes rutas metabólicas y su respuesta influenciaba a las reacciones inflamatorias de manera opuesta.

Los macrófagos M1 producen citocinas pro-inflamatorias, median la resistencia a patógenos, y producen moléculas antimicrobianas, todo esto también promoviendo a la destrucción tisular (Chávez y col., 2015). La activación clásica de los macrófagos se da por medio de IFN- γ secretado principalmente por linfocitos Th1, células T citotóxicas y células NK (Springall, y col., 2013), por LPS (Schaale y col., 2013) y por el GM-CSF que estimulan la producción de citocinas inflamatorias (Billiau y Matthys, 2009). Secretan citocinas como la IL-1 β , TNF- α , IL-12 e IL-18, y además fenotípicamente expresan grandes niveles del MHC-II, del marcador CD68 y de las moléculas de co-estimulación CD80 y CD86 (Okamoto y col., 2004). Recientemente se ha demostrado que también aumentan la expresión de proteínas intracelulares llamadas supresor de señalización de citocinas 3 (SOCS3) (Arnold y cols. 2014). Además, activan al óxido nítrico sintasa inducible (NOS2 o iNOS) generando NO (Zeidler y col., 2004) (Fig. 2).

No se tiene muy clara la ruta por la cual los macrófagos se diferencian, pero se tiene información de algunas moléculas que están involucradas en este proceso, como la familia de factores regulatorios del interferón (IRF), transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT), además de SOCS (Chávez y col., 2015). El LPS puede estimular la generación de macrófagos M1 por medio de la interacción con el receptor TLR4, induciendo la fosforilación de STAT1 α y STAT1 β . Esta ruta es independiente del factor de

diferenciación mieloide de respuesta primaria (MyD) 88 pero es Toll/IL-1R (TIR) dependiente (Toshchakov y col., 2002).

Los macrófagos M2 se activan por una vía diferente a la clásica. El estímulo de moléculas como el factor estimulante de colonias (CSF)-1, IL-4, IL-10, TGF- β y IL-13, además hongos e infecciones por helmintos favorecen el crecimiento de la población de los macrófagos M2. Esto provoca la liberación de altas concentraciones de IL-10 y pocas de IL-12 (Martínez y col., 2008; Jenkins y col., 2013) (Fig. 2).

Se han encontrado diferentes receptores de expresión que podría ser utilizados para la diferenciación de las poblaciones M1 y M2 como el CD206 y CD163, pero se ha demostrado que no hay diferencias con las poblaciones de M1, a menos que haya cierto tipo de estímulos (Barros y col., 2013; Jaguin y col., 2013). Hasta ahora se sabe que el gen de respuesta al complemento (RGC-32) es relevante en la diferenciación a la población M2 bajo el estímulo de M-CSF o IL-4 (Zhao y col., 2014), también, existe sobreexpresión de genes como arginasa 1 (*Arg1*), MMR (*Mrc1*) y la molécula α tipo resistina (*FIZZ1*) en el perfil genético de los macrófagos M2 (Raes y col., 2002). Se ha demostrado que la subunidad p50 del factor nuclear (NF)- κ B, en la forma de homodímero, tiene una actividad de regulación esencial para la polarización a M2, tanto *in vivo* como *in vitro* (Porta y col., 2009). Además, parece que IL-21 puede afectar la polarización hacia M2 al inhibir la fosforilación de la proteína cinasa regulada por señal extracelular (ERK) y reduciendo iNOS, lo que lleva al incremento de STAT-3 (Li y col., 2013).

Otra subpoblación de macrófagos es la CD169+, la cual se aisló de hígado, bazo, médula ósea y nódulos linfáticos y tienen la habilidad de unirse a los eritrocitos (Crocker y Gordon, 1986). En un ensayo de infección por el virus Ankara recombinante (MVA) expresando en gen de la proteína verde fluorescente o GFP bajo en control del promotor P7.5, se observó que los macrófagos CD169+ del seno subcapsular de los ganglios linfáticos eran los principales productores de IFN tipo 1 y parecen ser esenciales para el reclutamiento de células NK (Lehmann y col., 2016).

Se creía que el TCR era exclusivo de las células T, pero se ha reportado que poblaciones de neutrófilos, eosinófilos y una subpoblación de macrófago la expresa (Puellmann y col., 2006; Legrand y col., 2009; Kaminski y cols 2013). El TCR es una molécula necesaria para el reconocimiento del antígeno con una amplia especificidad, formando un complejo con el CD3 (Puellmann y col., 2006). Los macrófagos TCR+ tienen la habilidad de liberar al ligando

de quimioquinas (CCL)-2 (o MCP-1) y poseen una gran capacidad de fagocitosis (Beham y col., 2011).

Por último, existe una población de macrófagos, llamados macrófagos asociados a tumores (TAMs) (Mantovani y Allavena, 2015), los cuales se infiltran en los tumores y han sido estudiados para entender los mecanismos de inflamación en el cáncer (Mantovani y col., 1992; Sica y Mantovani, 2012; De palma y Lewis, 2013). En tumores primarios y sitios con metástasis, los TAMs participan en interacciones bidireccionales complejas con células tumorales, células madre cancerosas, fibroblastos, células madre mesentéricas, células endoteliales, linfocitos T, B y células NK (Mantovani y Allavena, 2015).

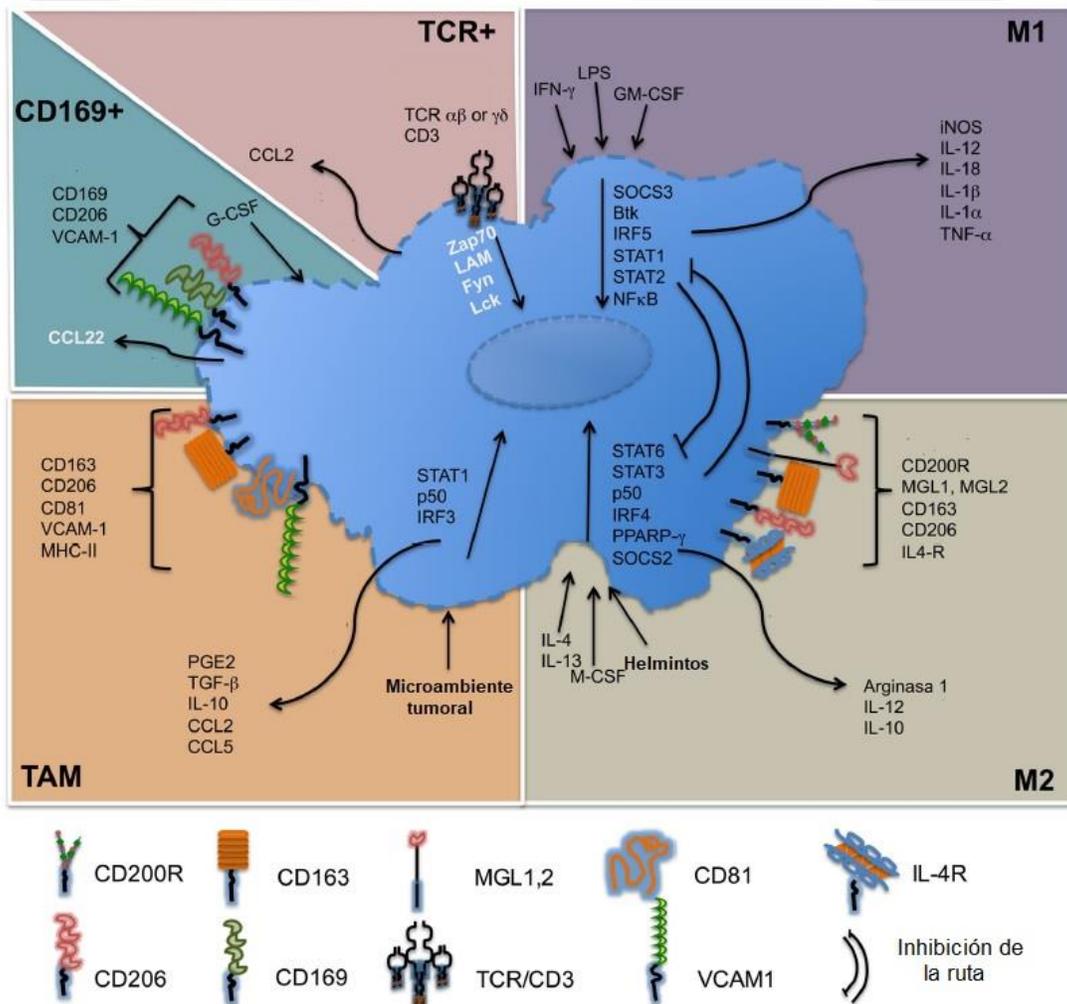


Figura 2. Moléculas asociadas con las subpoblaciones de los macrófagos. Moléculas en color negro indican las moléculas usualmente descritas, y las blancas son especificadas en circunstancias específicas y pueden presentarse en diferentes concentraciones (Chávez y col., 2015).

1.2 Virus Sincitial Respiratorio

El virus sincitial respiratorio (RSV) fue aislado en 1956 como el agente coryza de chimpancé (CCA) durante un brote de enfermedad respiratoria en una colonia de chimpancés (Morris y col., 1956). El RSV pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Pneumovirinae*, género *Orthopneumovirus* (Rima y col., 2017).

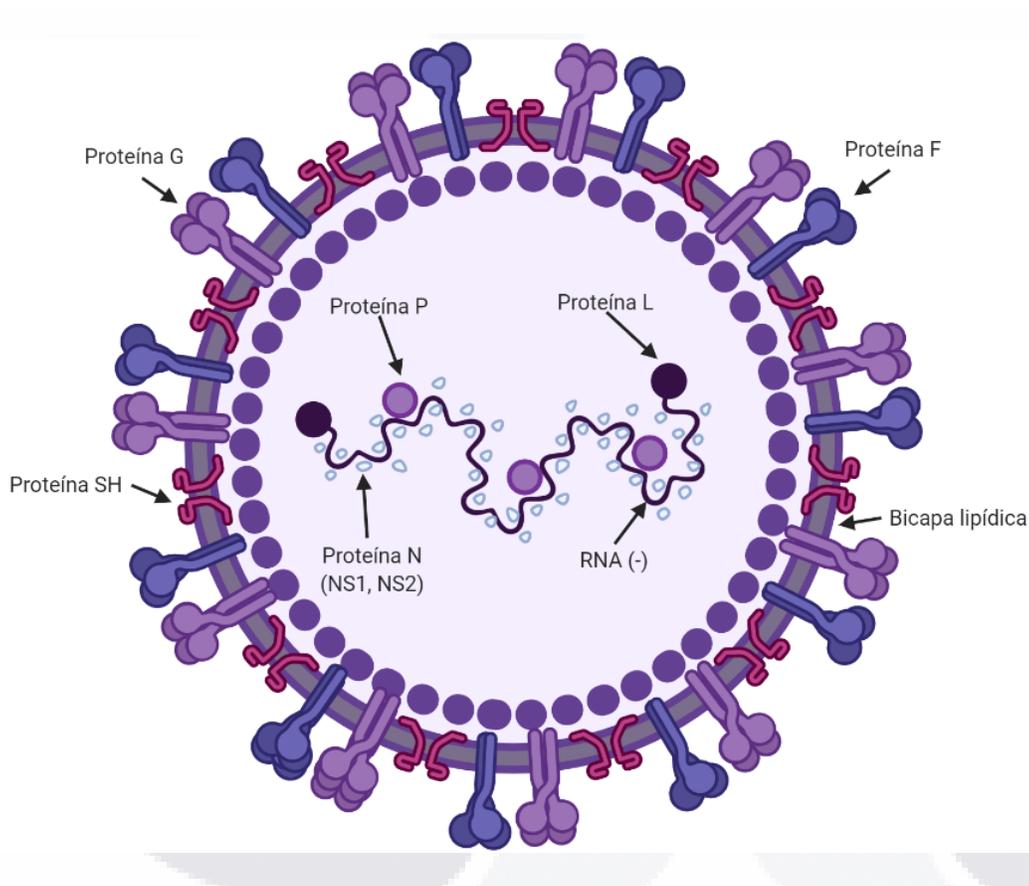


Figura 3. Esquema del Virus Sincitial Respiratorio (Modificado de Ávila y Castellanos, 2013). Creada con BioRender.com

Es un virus con envoltura lipídica (Kalica y col., 1973). Su información genética es RNA no segmentado de cadena sencilla con polaridad negativa (Collins y col., 1987). La nucleocápside tiene un tamaño de 150 a 300 nm de diámetro y tiene glicoproteínas ancladas en la membrana. Su genoma está compuesto por 15,222 nucleótidos (Mink y col., 1991).

El genoma codifica para 11 proteínas: no estructurales (NS1, NS2), nucleocápside (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M1, M2), proteína hidrofóbica pequeña (SH), glicoproteínas de fijación superficial (G), glicoproteínas de fusión superficial (F) y RNA polimerasa dependiente de RNA (L) como se muestra en la figura 4.

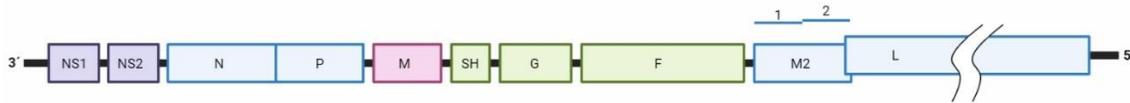


Figura 4. Mapa del RNA genómico viral. Los genes involucrados en la síntesis de RNA están en azul, las proteínas de superficie en verde, la proteína de matriz en magenta, y las dos proteínas no estructurales en morado. La longitud se encuentra aproximadamente en escala, mostrando el genoma en sentido negativo de 3'- 5'. En el gen M2 se muestran los dos marcos de lectura abierto que se superponen para la generación de los dos mRNA de M2 y la región no traducida (UTR) del gen L. (Modificado de Collins y col., 1986) Creada con BioRender.com

La membrana lipídica que posee el virus proviene de la membrana plasmática de las células del hospedero durante el proceso de gemación (Kalica y col., 1973) y contiene 3 glicoproteínas transmembranales de superficie (Marty y col., 2004) (Fig. 3). La proteína G, la cual interviene en la unión del virus al receptor de la célula (Levine y col., 1987) y la proteína F, la cual produce la fusión del virón y la membrana celular hospedera, y participa en la formación de sincitios, que es el primer efecto citopatológico característico del virus que fue observado (Walsh y Hruska, 1983). Existe una tercera proteína de superficie SH, la cual su función no es conocida. Está altamente expresada en células infectadas pero su expresión en la membrana viral es muy poca (Olmsted y Collins, 1989) (Fig. 5).

La proteína de matriz del virón M no contiene glicosilaciones y se localizan bajo la membrana plasmática (Marty y col., 2004) por lo que interactúa con la nucleocápside (Ghildyal y col., 2002) y está asociada con las glicoproteínas de la envoltura sugiriendo estar involucrada en la morfogénesis del virón y su ensamblaje (Henderson y col., 2002). La nucleocápside está conformada por las proteínas N, P y L (Fig. 5), las cuales están asociadas con el RNA genómico. La proteína N se une fuertemente al genoma para formar una nucleocápside helicoidal (Tawar y col., 2009). Las proteínas NS1 y NS2 no se han detectado en los virones, pero se han encontrado en las células infectadas y participan en la replicación del virus (Huang y col., 1985; Evans y col., 1996). La proteína P es un co-

factor esencial de la polimerasa, además actúa como un adaptador que se une a N, M2-1 y L para mediar la interacción en el complejo de la polimerasa con la nucleocápside (Castagne y col., 2004). La proteína L tiene en su secuencia un dominio de polimerización (Fix y col., 2011), un sitio de unión a nucleótidos putativo que está involucrado en el “capping” o tapado de los mRNAs (metilación o guanilación) (Liuzzi y col., 2005), así como cambios en su secuencia que afectan la eficiencia de reconocimiento de señales de terminación del gen (Cartee y col., 2003). La proteína M2-1 o factor de procesividad de la transcripción forma homotetrámeros fosforilados y no fosforilados que se une al RNA o mRNAs de RSV e interactúa con la proteína P para la síntesis de RNA y también con la proteína M para mediar su transporte a cuerpos de inclusión e interactuar con la nucleocápside (Tran y col., 2009; Cartee y Wertz, 2001; Blondot y col., 2012). La proteína M2-2 es poco expresada en las células infectadas. Se sugiere tiene participación en la regulación de la síntesis de RNA, ya que esta proteína eleva su expresión junto con el curso de la infección (Bermingham y Collins, 1999; Cheng y col., 2005). También se ha observado su participación en la eficiencia de empaquetamiento (Teng y Collins, 1998). Las proteínas NS1 y NS2 no forman parte de la estructura del virus. Estas proteínas interfieren con la respuesta inmune innata incluyendo la señalización e inducción del IFN (Spann y col., 2005; Swedan y col., 2011). Además, inhiben la apoptosis, prologando la vida de la célula infectada (Bitko y col., 2007). También se han visto involucradas en el control negativo de la síntesis de RNA viral, evadiendo la activación del sistema inmune (Atreya y col., 1998).

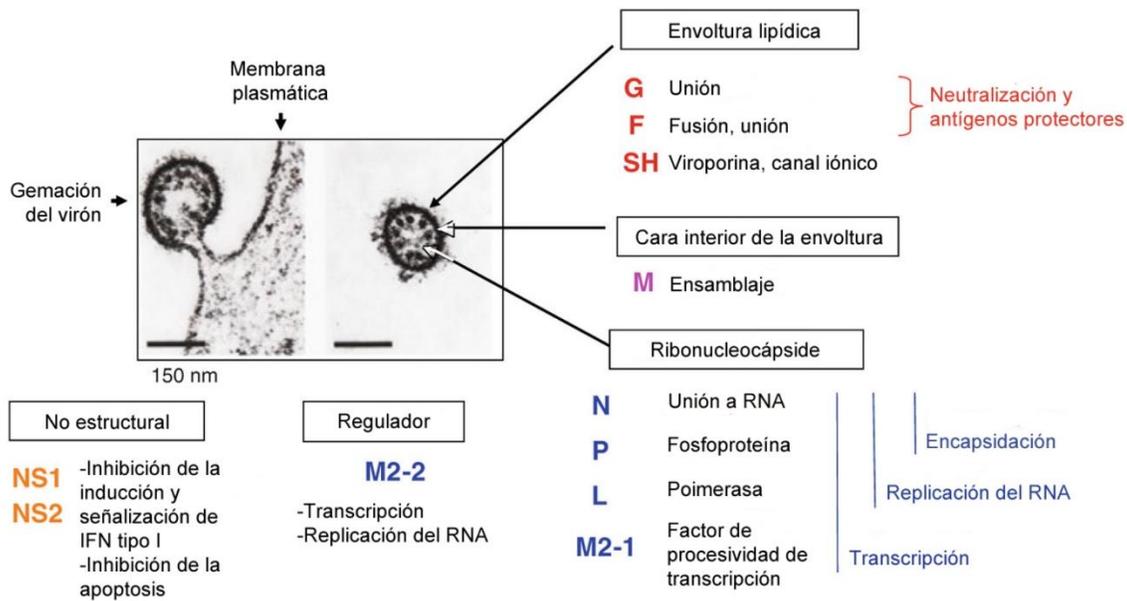


Figura 5. Proteínas del RSV: funciones y localización en el virión. Se muestran en referencia a las micrografías electrónicas de la gemación del virión teñido negativamente y virión libre. La envoltura lipídica del virus contiene tres glicoproteínas transmembranales virales de superficie: la glicoproteína G, la proteína de fusión F y la pequeña proteína hidrofóbica SH. La proteína no glicosilada M está presente en la parte interna de la envoltura. Tiene cuatro proteínas en la nucleocápside: la nucleoproteína N, la fosfoproteína P, el factor de procesividad de la transcripción M2-1 y la subunidad de polimerasa larga L. Las proteínas NS1 y NS2 forman parte del mecanismo de evasión del sistema inmune innato, inhibiendo la producción de IFN y retrasando la acción de las caspasas. La proteína M2-2 regula los sistemas de replicación (Collins y col., 2013).

La proteína F es sintetizada como un precursor inactivo de 574 aminoácidos que luego es escindido por proteasas celulares, como furina, durante el transporte a la superficie celular para producir dos polipéptidos unidos por puentes disulfuro, F2 surge de la región N-terminal y F1 de la C-terminal (Collins y Mottet, 1991). El polipéptido de la proteína F contiene tres secuencias hidrofóbicas, la primera es un péptido señal, localizado en la región N-terminal de la cadena F2, la segunda es el péptido de fusión en la N-terminal de la cadena F1, y la tercera es la región transmembranal, localizada cerca de la C-terminal de F1 (Chambers y col., 1992). También posee dos secuencias llamadas secuencias heptadas repetidas A y B o HRA y HRB (secuencias de repeticiones en tándem de una secuencia de aminoácidos), las cuales se cree que son estructuras que forman espirales (Chambers y col., 1992) y forman complejos triméricos en solución (Matthews, y col., 2000) (Fig. 6).

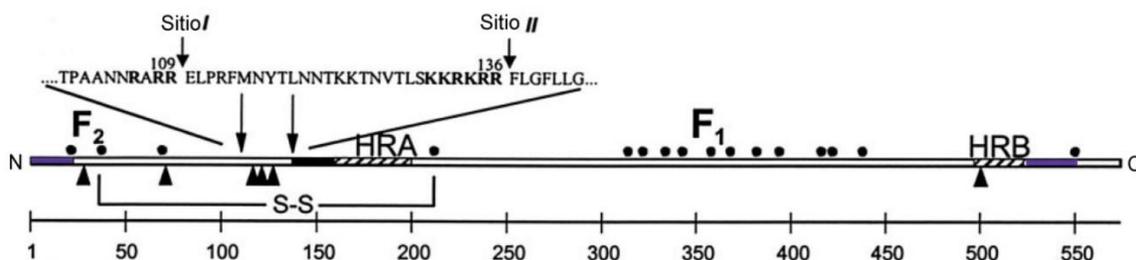


Figura 6. Diagrama de la estructura primaria de la proteína F. (•) Denota los residuos de cisteína, (▲) sitios potenciales de glicosilación, (■) regiones hidrofóbicas, (▨) las regiones de secuencias heptadas repetidas HRB y HRA y (↓) los sitios de escisión por proteasas como-furina. Se encuentra amplificada la secuencia de aminoácidos parcial de la proteína F donde se indican los motivos de la secuencia de furina (morado) y los sitios de escisión I y II (González, y col., 2001).

El RSV se clasifica en dos subgrupos o subtipos: A y B, que difieren en la secuencia de aminoácidos de las glicoproteínas de superficie, principalmente en la proteína G (Anderson y col., 1985). La proteína G puede variar hasta en un 44% entre estos dos subgrupos (Johnson y col. 1987). Además, se ha observado una diferencia del 20% en la secuencia de aminoácidos entre los mismos subgrupos A o B (Anderson y col., 1991; Cane y col., 1991). Esto le da al virus la capacidad de establecer reinfecciones en un mismo hospedero.

Para el mantenimiento del virus se han utilizado los cultivos celulares como la línea celular del carcinoma epidermoide humano (HEp-2), células primarias de riñón de mono o fibroblastos humanos (Eiros y col., 2009). También en otros cultivos celulares como células de cáncer cérvico uterino (HeLa) y carcinoma de pulmón (A549) (Krzyzaniak y col., 2013). El efecto citopático se espera dentro de los 3 a 7 días de la infección, esta permite identificar la replicación viral en la monocapa de las células, en las que se observan células degeneradas y redondeadas y de gran tamaño, que poseen más de un núcleo (Navarro y col., 1999).

1.2-1 Infección por RSV y características clínicas

El RSV es la causa más común de infecciones del tracto respiratorio bajo (ITRB) en personas de todas las edades. En Estados Unidos de América (E.U.A), se han reportado hasta 172 mil hospitalizaciones pediátricas entre niños menores a cinco años y va en aumento (Shay y col., 1999). A nivel mundial, se estima que el RSV causa cerca de 34 millones de episodios de ITRB en niños menores de 5 años, lo que resulta en aproximadamente 3,4 millones de hospitalizaciones por año (Nair y col., 2010). En los centros de control de enfermedades en E.U.A. se han reportado un promedio de 2,700 muertes al año por neumonía causada por el RSV (Thompson y col., 2003). A nivel mundial, se estima que el RSV causa el 2.3% de las muertes en recién nacidos de 0 a 27 días de edad, el 6.7% de niños entre 28 días a 1 año y 1.6% entre las edades de 1 a 4 años (Lozano y col., 2012). Se ha estimado que el RSV ha causado más muertes que cualquier otro agente infeccioso entre los primeros 28 días de vida al primer año, con excepción de la malaria (Lozano y col., 2012). En México, a pesar de presentar una mortalidad anual de 7.2 por cada 100,000 niños de 1 a 4 años y 109 por cada 100,000 en niños menores a 1 año por ITRBs, así como una incidencia de 36,627 por cada 100,000 en el 2006, la etiología del RSV no ha sido actualizada en los últimos años. Wong-Cheng y colaboradores (2010) realizaron un estudio poblacional entre enero del 2004 a octubre de 2006 con pacientes hospitalizados o que acudieron a consulta en Hospital Infantil de México, encontrando una frecuencia del RSV del 80%.

La persistencia de la infección de RSV puede presentarse por sus diferentes mecanismos de infección, ya que se ha visto la gran variedad de tipos celulares que puede infectar. Se ha observado la persistencia de la infección del RSV humano en pulmones de cobayo (Bramley y col., 1999; Dakhama y col., 1997), en líneas celulares de macrófagos, en modelos murinos (Guerrero-Plata y col., 2001), y cultivo de macrófagos humanos (Guerrero-Plata y col., 2004). Además, se ha demostrado la latencia (RNA genómico) de RSV y su persistencia (RNA mensajero) en ratón BALB/c, independientemente de la presencia de linfocitos T citotóxicos (LCT) RSV-específicos, e IgG RSV-específica (Schwarze y col., 2004).

El periodo de incubación del RSV es de 2 a 8 días, presentando un periodo más corto en la infección primaria en niños (Piedimonte y Perez, 2014). La infección se adquiere por la mucosa nasofaríngea, donde ocurre la replicación. La enfermedad se limita al tracto

respiratorio superior en 50-60% de los casos de la infección inicial. En el resto de los casos, el RSV se propaga en el tracto respiratorio inferior por aspiración de células que contienen RSV, así como la diseminación célula-célula (Corzo y Valdés, 2013). El RSV humano infecta al epitelio respiratorio por interacción con los dominios de unión a heparina en las glicoproteínas G con glicosaminoglicanos (GAGs) en la superficie celular (Martínez y Melero, 2000; Teng y col., 2001). Las glicoproteínas G y F son capaces de unirse a GAGs, siendo la proteína G la que interactúa con más relevancia por medio de estos dominios de heparina (Feldman y col., 1999).

Una vez ubicado en las células epiteliales ciliadas de los bronquiolos, la replicación viral lleva a una inflamación local por infiltración celular, lo que resulta en edema, producción elevada de moco, deterioro de la depuración y obstrucción ciliar. Todo esto provoca la resistencia en las vías aéreas y obstrucción parcial, y subsecuentemente el epitelio sufre de necrosis, y algunas veces el epitelio prolifera hacia el lumen causando su oclusión acompañada con el taponamiento de moco, lo que se representa como las características clínicas de la bronquiolitis. El proceso de recuperación comienza 3 a 4 días con la regeneración de las células epiteliales, mientras que la recuperación de las células ciliadas toma hasta 14 días (Noor y Krilov, 2018).

1.2-2 Respuesta del hospedero a la infección

La interacción del RSV con el epitelio de las vías respiratorias genera señalización celular, que a su vez resulta en la activación de mecanismos antivirales: citocinas, quimiocinas e inducción de elementos intrínsecos que regulan la supervivencia celular (proteína Bcl-2 y caspasas) (Tripp, 2004).

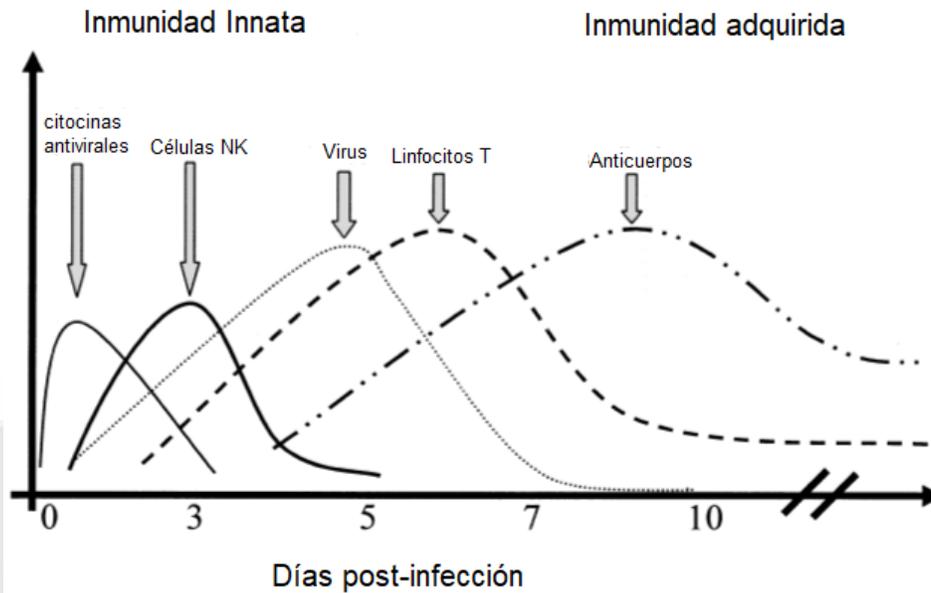


Figura 7. Mecanismos de defensa del hospedero contra la infección de RSV. Estos mecanismos requieren del sistema inmune innato y adaptativo. Las quimiocinas expresadas por la infección por RSV reclutan células inmunes a los sitios de infección. Las células NK responden de manera rápida a estas señales y secretan citocinas contra el virus que controlan la infección, y además activan células del sistema inmune adaptativo. Los linfocitos T que son reclutados en el sitio de infección se activan, proliferan y diferencian en células de efectoras y de memoria, las cuales desarrollan las respuestas citotóxica y humoral (Tripp, 2003). Las células citotóxicas reconocen a las células infectadas con el virus y controlan la infección mediando su muerte celular. Las células Teff tienen una vida media corta, sin embargo, un pequeño grupo de células T de memoria es mantenido. La respuesta humoral, mediada por las células B es importante en la resistencia a la reinfección, y como las células T de memoria es de larga duración (Tripp, 2004).

Respuesta inmune innata al RSV. La primera barrera de protección se da por la secreción de componentes como las colectinas (lectinas tipo C que contienen colágeno), lactoferrina y proteínas secretoras de las células exocrinas bronquiales en el tracto respiratorio que inhiben la unión del RSV por medio de sus glicoproteínas (Griese, 2002; Sano y col., 2003; Wang y col., 2003). Otros mecanismos inmunes innatos son activados por medio de los PRRs (Armant y Fenton, 2002), los cuales tienen una amplia especificidad por PAMPs que no se encuentran en el hospedero (Underhill y Ozinsky, 2002).

La familia de proteínas de colectina incluyen a las proteína surfactante-A (SP-A) y SP-D que funcionan como PRRs circulantes (no unidos a células) que reconocen restos de carbohidratos, inducen opsonización de partículas víricas e interactúan con células

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

fagocíticas (Lu y col., 2002; Shepherd, 2002). En particular, la SP-A se une a la subunidad F2 de la glicoproteína F, la cual está altamente glicosilada y neutraliza la infección de RSV de forma calcio dependiente (Ghildyal y col., 1999). Los TLRs se especializan en el reconocimiento de algunos PAMPs. Se ha observado que la glicoproteína F estimula a la inmunidad innata por medio de la activación de CD14 y TLR4 (Kurt-Jones y col., 2000), así como se ha demostrado que ratones con deficiencia de TLR4 que han sido retados con RSV presentaron alteración del tráfico celular de células NK y CD14⁺ en el pulmón, así como deficiencia funcional de células NK, alteración de la expresión de IL-12 y baja depuración del virus. En niños con bronquiolitis asociada a RSV hay un incremento de la expresión de TLR4 en los monocitos de sangre periférica (Haynes y col., 2001). La infección parecer ser inicialmente TLR4-dependiente y la replicación del RSV TLR4-independiente (Haeberle y col., 2002).

Se han observado patrones de citocinas cuando está presente la infección del RSV, como el aumento del perfil Th1 (IL-2 y IFN- γ) y Th2 (IL-4 y IL-6) y del mRNA de quimiocinas de la familia CC (o β , de cisteínas adyacentes), como la proteína inflamatoria de los macrófagos (MIP)-1 α , MIP-1 β , quimiocina de regulación por activación expresada y secretada por los linfocitos (RANTES), en lavados nasales y aspirados de la tráquea. MIP-1 α y RANTES son quimiocinas que se han correlacionado con la bronquiolitis severa causada por RSV (Hull y col., 2003).

Los motivos CX3C presentes en las glicoproteínas G tienen un papel importante en provocar la respuesta inmune del hospedero al producir niveles bajos de IFN- γ y IFN- λ comparado con IFN- α . Esto sugiere que CX3C obstaculiza la ruta del IFN. Además, el motivo CX3C tiene una composición molecular similar a CX3CL1 o fractalquina, lo que facilita la unión con el receptor de fractalquina CX3CR1 en células epiteliales de la vía aérea humana, el principal sitio de infección en humanos (Chirkova y col., 2015).

Las células de la respuesta inmune innata que responden a citocinas y quimiocinas son los macrófagos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos y células NK. Estas células son reclutadas para el control de la infección, pero al existir una respuesta exacerbada provocan inflamación y contribuyen a la patogénesis de la enfermedad.

La infección por RSV provoca una respuesta sistémica de atracción de neutrófilos, especialmente en el tracto respiratorio (Smith y col., 2001; O'Donnell y col., 2002). Los neutrófilos son el tipo celular más predominante en el fluido bronquioalveolar (BAL) de los

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

pulmones de niños con bronquiolitis severa por RSV y de aquellos que tienen una infección moderada (Everard y col., 1994). Durante la infección severa, el virus interactúa directamente con los neutrófilos. Las células de la sangre periférica y del BAL expresan proteínas del RSV como la F, G y N (Halfhide y col., 2011). El RNA y mRNA del RSV también están presentes de forma intracelular, esto por la fagocitosis del virus o replicación de este en los neutrófilos (Yui y col., 2003). Las células NK que circulan durante la infección tienen una expresión mayor del miembro de la subfamilia B del receptor tipo inmunoglobulina leucocitaria inhibitoria (LILRB1), sugiriendo que contribuyen con la regulación de la inflamación durante la infección (Noyola y col., 2015). También se ha reportado la acumulación de células NK que expresan granzima B en el tracto respiratorio de niños por bronquiolitis severa por RSV (Kerrin y col., 2016) (Fig. 7).

Respuesta inmune adaptativa al RSV. La inmunidad adaptativa es mediada por los linfocitos B y los linfocitos T, las cuales dan especificidad antigénica, diversidad del reconocimiento al antígeno y memoria a la respuesta inmune.

Las DCs son movilizadas de la circulación a la mucosa durante la infección temprana, y el conteo de estas células se aumenta durante la infección (Gill y col., 2008). La proteína F se asocia a moléculas del MHC de clase II de las DC en la mucosa nasal, y la migración selectiva de estas células las hace de crucial importancia como CPA durante la infección por RSV (Gill y col., 2005). Se han encontrado DC en las vías respiratorias bajas de niños en bronquiolitis severa por RSV, donde estas exhiben un fenotipo proinflamatorio activado (Kerrin y col., 2016). Las DC circulantes expresan al marcador CD83 y la molécula co-estimuladora CD40. La presencia y concentración de citocinas proinflamatorias como IL-6, TNF- α e IL-8; así como citocinas liberadas por células T como el IFN- γ , IL-13, IL-10 y IL-2 en BAL, se correlaciona con la cantidad de DC (Russell y col., 2017).

Los macrófagos alveolares que se han obtenido del BAL de niños infectados co-expresan glicoproteínas de la superficie del RSV, moléculas del MHC de clase II, IL-1 β y TNF- α citoplasmático, sugiriendo una regulación inmune local y un rol en la presentación de antígeno (Panuska y col., 1992; Midulla y col., 1993). Los monocitos CD69+ están presentes en tejido de pulmón en casos críticos de infección por RSV (Johnson y col., 2007). En circulación, los monocitos exhiben disminución de la expresión del TLR8 y producción de TNF- α durante la infección aguda por RSV, lo que lleva consecuentemente a la convalecencia (Bendelja y col., 2010). En contraste, los monocitos circulantes incrementan su expresión del TLR4 en la infección (Bendelja y col., 2010) (Fig. 7).

La primera respuesta humoral es en las vías respiratorias superiores por medio de la secreción de IgA, pero la respuesta humoral más durable está asociada a IgM (Welliver y col., 1980; Crowe y col., 2001b). Aunque se ha observado en estudios clínicos que los anticuerpos anti-RSV presentes en suero y mucosa protegen contra la infección o reinfección del RSV (Crowe, 2001a), estos también pueden contribuir a la patogénesis de la enfermedad. Los anticuerpos que pueden reaccionar con el RSV pueden mediar la progresión de la infección en células que expresan el receptor Fc, como los macrófagos y células B, esto por medio de los anticuerpos no neutralizantes o sub-neutralizante, los cuales aumentan la enfermedad al hacer complejos con el virus facilitando la unión del virus con la membrana celular por medio de los receptores Fc (Krilov y col., 1989; Valarcher y col., 2001). La formación de complejos de anticuerpos sub-neutralizantes con el virus y la infección de monocitos/macrófagos ya había sido descrito como un mecanismo patológico durante la segunda infección del virus del dengue, resultando en una infección severa (Porterfield, 1982). Durante los primeros estudios del aumento de enfermedad por anticuerpos se observó que el aumento de la producción de virus se aproximaba hasta 100-1000 veces más, dado por la unión de los complejos inmunes a los receptores FcγRI y FcγRIIa, lo que produce un mayor número de células infectadas en presencia de anticuerpos, en comparación con la ausencia de éstos (Halstead, 1982; Halstead y col., 1977; Halstead y O'Rourke, 1977).

Ubol y Halstead (2010) clasifican a las infecciones aumentadas por anticuerpos en 3 diferentes escenarios, las cuales requieren un evento inmunológico inicial o sensibilización: (1) infecciones primarias con virus heterotípicos de origen natural de los mismos géneros, (2) infecciones de virus que crean diversidad antigénica por la rápida evolución de las variantes biológicas o antigénicas durante el curso de una infección crónica, e (3) inmunizaciones que resultan en inmunidad protectora incompleta. En el caso del RSV, la producción de anticuerpos no neutralizantes o sub-neutralizantes se asocia con una pobre activación del TLR (Delgado y col., 2009). Se postuló inicialmente que el virus inactivado por formaldehído utilizado en las vacunas reducía la capacidad de protección de los anticuerpos por el incremento de grupos carbonilo reactivos que favorecían las respuestas Th2 (Moghaddam y col., 2006). En ratones se demostró que la formalina utilizada en la vacuna para inactivar al virus genera anticuerpos de baja avidéz causado por una maduración sub-óptima de las DCs, producción reducida de los factores de activación CD40, CD80 y CD86 y la disminución de la formación del centro germinal en los ganglios linfáticos (Delgado y col., 2009). Por lo tanto, si la activación del TLR es pobre por las vacunas contra

el RSV inactivado, no hay maduración y se producen anticuerpos no neutralizantes (Ubol y Halstead, 2010).

Los LCT se pueden encontrar en sangre periférica de niños con RSV agudo (Chiba y col., 1989). Para observar la participación de CD8⁺ y CD4⁺ se han hecho estudios en ratón BALB/c, en los cuales los dos tipos celulares detuvieron la replicación del RSV (Graham y col., 2000; Graham y col., 2002) y al parecer las proteínas M2, F y N son los blancos de estos LCT (Nicholas y col., 1990; Openshaw, 1995). En estudios murinos similares se ha observado que la infección del RSV induce una mezcla de citocinas de los perfiles Th1/Th2, con una limitada patogénesis de la enfermedad, además que el IFN- γ en estados tempranos de la enfermedad es importante para controlar el balance de citocinas Th1/Th2 (Openshaw, 2002; Spender y col., 1998). La ausencia de IFN- γ provoca la dominancia de la respuesta Th2, incrementando la severidad de la enfermedad (Hussell y col., 1997).

1.2-3 Profilaxis en la infección por el RSV

En las patogénesis por la infección de un virus respiratorio se adquiere resistencia en la reinfección del mismo virus por la protección cruzada contra epítomos antigénicos conservados entre cepas como en el caso del virus de la influenza (Vemula y col., 2017) y el rinovirus (Barclay y col. 1989). Por el contrario, con la infección del RSV, hay repetidas infecciones con una cepa diferente o la misma (Peret y col., 2000), además de que la infección persiste o presenta latencia en el huésped (Guerrero-Plata y col., 2004). Este patrón de reinfección por el RSV y su persistencia se observó a finales de 1960 con las pruebas de la vacuna del RSV inactivada con formalina (FI-RSV), donde al principio se observó un aumento de la enfermedad pulmonar tras la infección natural con RSV (Kapikian y col., 1969a). A la vacuna se le atribuyó pobre protección, desarrollo de complejos y una respuesta inmune desbalanceada (Polack y col., 2002). Al examinar el suero de pacientes vacunados con FI-RSV se observaron altos títulos de anticuerpos de la glicoproteína F con poca actividad neutralizante (Murphy y col., 1986). Una de las teorías es la alteración de la proteína F, ya que la conformación pre-F no se encuentra en la superficie del RSV inactivado, generando una respuesta inmune inapropiada para una infección natural del RSV posterior (Killikelly y col., 2016).

Investigaciones posteriores demostraron que la vacuna inactivada no produjo anticuerpos neutralizantes y falló en activar a los linfocitos T CD8⁺, por lo tanto, cuando se dio la infección natural, esta persistió e indujo una respuesta exacerbada de células CD4⁺ y citocinas en el tracto respiratorio inferior, aumentando la enfermedad (Chin y col., 1969).

La proteína de superficie membranal F se encuentra en dos estados: en el de pre-fusión (pre-F) metaestable y en el estado de post-fusión (post-F). El monómero de la proteína F es sintetizado como un precursor inactivado (F0) que necesita ser escindido en dos sitios polibásicos (sitio I y II) para convertirse en una proteína de fusión funcional (González y col., 2001). La proteína F se mantiene estable en su conformación pre-F (Lamb, 1993), y cuando la fusión ocurre adquiere una conformación altamente estable de post-F conformada por 6 hélices con 2 secuencias repetidas (HRA y HRB) en cada monómero (Lamb y Jardetzy, 2007). El anticuerpo Palivizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado que está dirigido contra la glicoproteína F del RSV humano (hRSV) (Magro y col. 2012) y casi todos los anticuerpos monoclonales (MAbs) anti-F descritos pueden reconocer la conformación post-F de la proteína F. Sin embargo, Palivizumab no es efectivo terapéuticamente (De Fontbrune y col., 2007).

Se han descrito en la proteína F sitios antigénicos importantes por medio de anticuerpos monoclonales, pero estos se encuentran en la conformación de pre-F (Calder y col., 2000). Estos sitios se han localizado por ensayos en péptidos sintéticos (Bourgeois y col., 1991), fragmentos de proteína expresados en bacterias (Martín y col., 1991) o en la secuencia de mutantes de escape que crecen en presencia de anticuerpos monoclonales individuales (Arbiza y col., 1992). Uno de estos sitios se encuentra antes de la región rica en cisteína (sitio II) y el otro cerca de la región C-terminal del cluster de cisteína (sitio IV, V y VI) (López y col., 1998).

La conformación estable del pre-F ha demostrado tener gran inmunogenicidad, por lo que puede ser un candidato a vacuna. Corti y col. (2013) aislaron anticuerpos neutralizantes de donadores con altos títulos de anticuerpos de RSV humanos y Metaneumovirus humano (HMPV), de los cuales aislaron al anticuerpo MPE8, el cual hace neutralización cruzada con el HMPV. Demostraron que MPE8 se une a un epítipo altamente conservado que se encuentra en la superficie de la proteína F en pre-F, pero no en post-F.

Otro de los retos en el desarrollo de una vacuna contra RSV es co-estimular la respuesta inmune activando rutas de transducción de señales que modulen la respuesta innata y

adaptativa, con la habilidad de superar los mecanismos de evasión celular, sin toxicidad adversa y con dosis terapéuticas. Se ha demostrado la eficacia de anticuerpos agonistas contra receptores co-estimulantes, pero estos están asociados con toxicidad severa en modelos murinos y en humanos (Hixon y col., 2001; Niu y col., 2007; Suntharalingam y col., 2006). El uso de co-estimuladores y/o sus ligandos naturales puede tener una mayor eficacia y ser más seguros comparados contra los anticuerpos agonistas, no sólo por generar nuevas respuestas inmunes o incrementar las ya existentes, también por su habilidad en superar a los mecanismos de evasión del sistema inmune (Sharma y cols, 2009). Una de las señales co-estimuladoras traducidas vía CD28 y por miembros de la familia TNFR juegan un papel importante en la modulación del sistema inmune innato, adaptativo y regulatorio (Watts, 2005).

1.3 Co-estimuladores en la presentación de antígeno

Como mencionábamos en el apartado 1.1, la activación de los linfocitos T requiere de dos señales: la específica dada por el MCH y el TCR y la no específica dada por las moléculas de co-estimulación (Figura 8). La activación completa de la célula con ayuda de la segunda señal está dada por la interacción de receptores en el LT con ligandos en la CPA (sinapsis inmunológica) (Watts, 2005) .

La co-estimulación juega un papel fundamental en la regulación de las funciones de los LT en diferentes niveles, principalmente durante la presentación de antígeno (Liechtenstein y col. 2012). Estas señales son activadas por una gran variedad de co-estimuladores como los receptores CD27 y CD80/CD86, y sus ligandos CD70 y CD28 respectivamente, que dan señales de proliferación de LT y adquisición de actividades citotóxicas (Hendriks y col., 2003; Nurieva y col., 2006).

Dentro de las moléculas co-estimuladoras existen dos familias, la familia CD80/CD86 y la familia del TNFR/L. Miembros de la familia TNF son mediadores clave de la señalización de supervivencia en LT posteriores a los efectos iniciales de la interacción CD28/CD80-CD86 (Sprent y Surh, 2002).

La superfamilia TNFR está caracterizada por la presencia de 3-6 patrones de motivos ricos en cisteína en sus dominios extracelulares (Smith y col., 1994). Este tiene como blanco

ligandos que tras la interacción con el receptor promueven la sobrevivencia, inflamación o inducción de la muerte celular, como los receptores CD40, CD27, HVEM, TACI y TWEAK (Croft y col., 2013; Moran y col., 2013). La biología de los TNFRs es compleja, ya que los receptores y ligandos actúan en muchas células del sistema inmune, e incluso dentro de la misma célula (Locksley y col., 2001; Watts, 2005). Los miembros de la familia TNFR se pueden clasificar en 3 grupos: los que contienen el dominio de muerte (receptores-DD, del inglés “death domain”), receptores señuelo que no transmiten señal y receptores que requieren de unión a las moléculas adaptadoras intracelulares conocidas como factores asociados al receptor TNF (TRAF) para transmitir señalización (Locksley y col., 2001; Dempsey y col., 2003; Aggarwal, 2003). En el caso de la inmunidad viral, los miembros de la familia que son inducidos y expresados son 4-1BB (CD137), CD27, OX40 (CD134), GITR y TNFR2.

1.3-1 El señalosoma 4-1BB/4-1BBL

El ligando 4-1BBL o CD-137L (en la proteína recombinante de este trabajo denominada como BBL) es una proteína transmembranal tipo II de la superfamilia del TNF, concretamente de la superfamilia 9 (Pollok y col., 1994). Existe como un monómero de 30 kDa y como un dímero de 55 kDa en la superficie de las células T. Este ligando se aisló por primera vez de clonas de células T murinas por un proceso de escáner diferencial (Kwon y Weissman, 1989), y tiene efectos pleiotrópicos en la señalización de varias células de sistema inmune innato y adaptativo (Saoulli y col., 1998; Wilcox y col., 2002; Myers y col., 2005), efectos regulatorios (Robertson y col., 2008); así como una gran eficacia terapéutica de anticuerpos agonistas 4-1BB en varios modelos murinos (Myers y col., 2005).

4-1BB (CD137) es un receptor transmembranal tipo I cuya expresión se da en múltiples células hematopoyéticas (Vinay y Kwon, 2011). Mientras se sabe que es regulada positivamente en células T CD8+ luego de su activación (Shuford y col., 1997), la proteína 4-1BB también puede ser expresada en células T cooperadoras CD4+ (Kim y col., 2003), linfocitos B, linfocitos T reguladores, células NK, células NKT, monocitos, macrófagos, neutrófilos, mastocitos y eosinófilos (Pulle y col., 2006; Sabbagh y col., 2007), osteoclastos (Yang y col., 2008), timocitos (Kim y col., 2009b), células progenitoras mieloides tempranas (Jiang y Shwarz, 2010) y células del endotelio activadas (Drenkard y col., 2007). Sólo es

conocida una subpoblación de DCs y Treg que expresan 4-1BB de forma constitutiva (Sabbagh y col., 2007). La expresión de 4-1BB no es exclusiva de células hematopoyéticas, varias células de parénquima también expresan este receptor en condiciones de inflamación como células endoteliales en capilares sanguíneos y en lechos tumorales (Jiang y col., 2008).

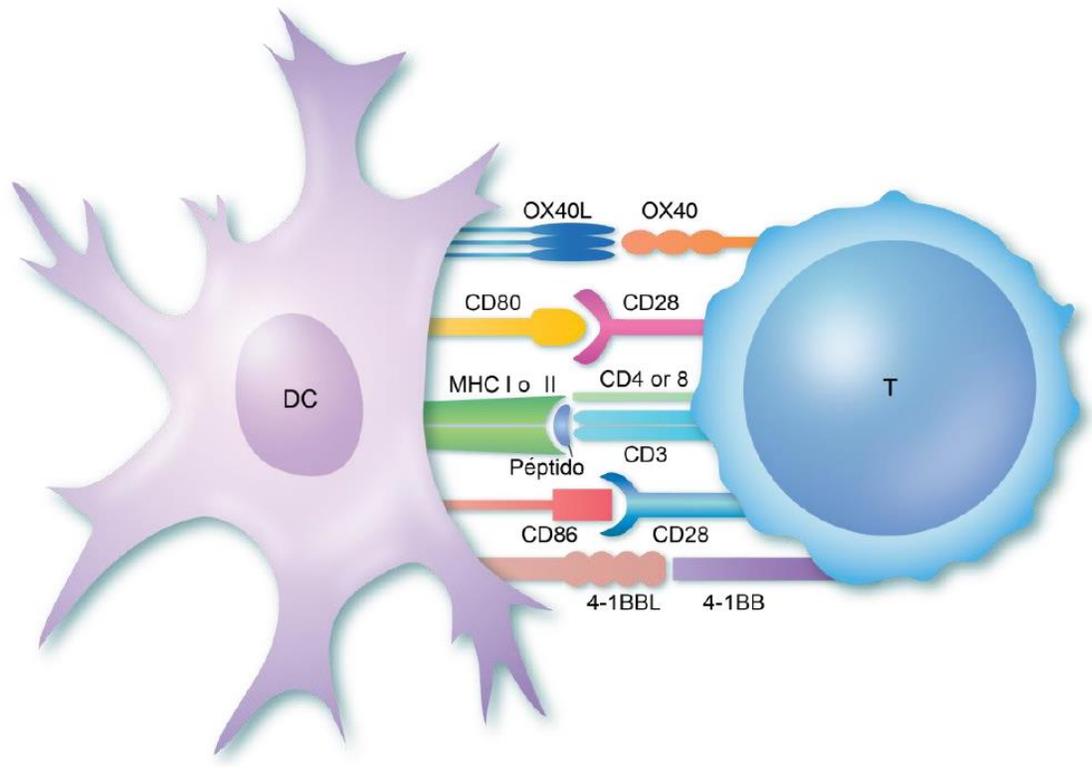


Figura 8. Activación de linfocito T. El linfocito T al encontrarse con la DC recibe la primera señal con la unión de la molécula del MHC y el péptido procesado con el TCR, junto con la interacción de CD4 o CD8 con la correspondiente molécula MHC clase II o clase I. De forma simultánea, la co-estimulación o segunda señal ocurre tras la unión de CD86, CD80, OX40L y 4-1BBL de la DC con sus correspondientes receptores en el linfocito T. Esto induce la activación completa para la función efectora de la célula T (Cavanagh, British Society for Immunology).

El entrecruzamiento de 4-1BB con sus anticuerpos agonistas o con su ligando natural da como resultado una fuerte señal de co-estimulación a los linfocitos T (Fig. 8), realizando un efecto sinérgico con la señal primaria del TCR con aumento de la proliferación celular e inducen la secreción de citocinas como la IL-2 y IFN- γ (Futagawa y col., 2002). Se han

estudiado 6 miembros de la familia TRAF (TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4, TRAF5 y TRAF6) (Zapata y col., 2018), los cuales participan en la transducción de señales directa o indirectamente con la unión a CD40, CD30, con excepción del TRAF4. TRAF2 es capaz de regular la activación de NF- κ B por CD40 y CD30. La cinasa inductora de NF- κ B (NIK) también es una molécula responsable de mediar la activación de la ruta de NF- κ B por medio de TNFR, IL-1R y Fas. NIK se une a los TRAFs para activar NF- κ B cuando está sobre expresado (Fig. 9) (Sanchez y col., 2016). También se ha reportado que TRAF1, TRAF2 y TRAF3 están asociados directamente con 4-1BB, y que dos moléculas de señalización intracelular, TRAF2 y NIK están relacionadas en la activación de NF- κ B mediada por 4-1BB (Jang y col., 1998).

Mientras TRAF2 es expresado tanto en los linfocitos T activados y en reposo, la expresión de TRAF1 es inducida tras una activación (Zapata y col., 2000; Schwenzer y col., 1999). Así, como la expresión de 4-1BB también es inducida en células T activadas (Shuford y col., 1997; Cannons y col., 2001) tanto 4-1BB como TRAF1 coexistirán en células T activadas, donde la actividad co-estimuladora de 4-1BB es necesaria para la expansión de linfocitos y el aumento de sus funciones efectoras.

4-1BB, así como otros miembros de la familia de TNFR, utilizan a los TRAFs como andamios proteicos para formar un señalosoma, específicamente reclutando a TRAF1, 2 y 3 (Arch y Thompson, 1998; Jang y col., 1998; Saoulli y col., 1998). La asociación de diferentes TRAFs en un mismo trímero de 4-1BB activado es indiferente ya que TRAF1 y 2 pueden formar heterodímeros (Zheng y col., 2010). TRAF2 tiene una función importante para 4-1BB, ya que el dominio RING (dedos de zinc) que posee en su región N-terminal le proporciona actividad de ubiquitin-ligasa E3. También puede catalizar proteínas ubiquitinadas en K-48 y K-63, esta última mediada por la proteína de conjugación-ubiquitinación (Ubc)-13 (Alvarez y col., 2010; Habelhah y col., 2004). Los trímeros de TRAF2 y heterotrímeros TRAF1:(TRAF2)₂ reclutan al inhibidor celular de la proteína de la apoptosis 1 (cIAP1/2) (Zheng y col., 2010), el cual al unirse al dominio RING de TRAF2 permite la unión de ubiquitin-ligasas (Lopez y col., 2011). Los homodímeros de TRAF1, al no poseer el dominio RING, no tienen la capacidad de la formación de estos dímeros ni adquirir actividad ubiquitin-ligasa (Zheng y col., 2010), pero puede contribuir en el reclutamiento de la proteína-1 específica de leucocito (LSP-1), la cual está involucrada en la activación de la proteína cinasa ERK mediada por 4-1BB (Sabbagh y col., 2013). Después de estas interacciones, el señalosoma recluta K63-ubiquitina, mayormente unidas a TRAF2.

Las cadenas de poliubiquitina que se unen al carboxilo terminal a las moléculas de ubiquitina con el K63 de la siguiente ubiquitina son sitios de acoplamiento para los componentes de señalización río abajo, formando un señalosoma efectivo (Chen, 2012; Chen y Chen, 2012; Komander y Rape, 2012). El componente que se recluta río abajo después de K63-TRAF2 es un complejo de cinasas compuesto por la cinasa activada por TGF- β (TAK)-1 y proteínas de unión a TAK (TAB)-1, 2 y 3 (Fan y col., 2010). Una vez activado, TAK1 fosforila a la cinasa del inhibidor del NF- κ B (IKK)- β , activando a la ruta canónica de NF- κ B (Chen, 2012), la no canónica (McPherson y col., 2012) y ERK 1/2 (Sabbagh y col., 2008). TAK1 También activa las cinasas activadoras de las MAPK, lo que resulta en la activación de la MAPK p38 (Cannos y col., 2000).

Estos eventos de señalización terminan en la activación de NF- κ B y MAPK (Fig. 9) (Kang y col., 2007; Mack y col., 2008). La interacción del 4-1BB/4-1BBL traduce la señal necesaria para su activación a las células T CD8+ de manera independiente a CD28, estimulando a estas células a producir citocinas, proliferar y adquirir función efectora (Saoulli y col., 1998). Esta señalización inhibe la muerte celular inducida por activación (AICD) en células T (Mittler y col., 2004), promueve supervivencia (Lee y col., 2003) y es crítica para la formación de memoria inmunológica por medio del aumento de genes anti-apoptóticos Bcl-2, Bcl-x y Bfl-1 (Lee y col., 2002; Dawicki y Watts, 2004) e induce la proliferación de células T y mejora la función efectora (Shuford y col., 1997). Además de aumentar la producción de IFN- γ y TNF α (Ju y col., 2007), la activación del 4-1BB induce la producción de IL-13 en células T CD8+ y CD4+ para limitar la inflamación (Shin y col., 2007). La producción de IFN- γ activa la expresión de indolamida 2,3-dioxigenasa (IDO) por DC, las cuales pueden atenuar la respuesta efectora mediada por 4-1BB (Kim y col., 2009a). Además, la señalización de 4-1BB induce la maduración de DC, aumentando los ligandos CD28 co-estimuladores, incrementando la supervivencia de DC y reforzando la producción de citocinas inflamatorias (Kuang y col., 2012; Lee y col., 2012). La interacción 4-1BB/4-1BBL promueve selectivamente citocinas del perfil Th1 como IL-2, TNF- γ , IL-6, TNF- α e IL-2, erradicando la infección crónica (Shuford y col., 1997).

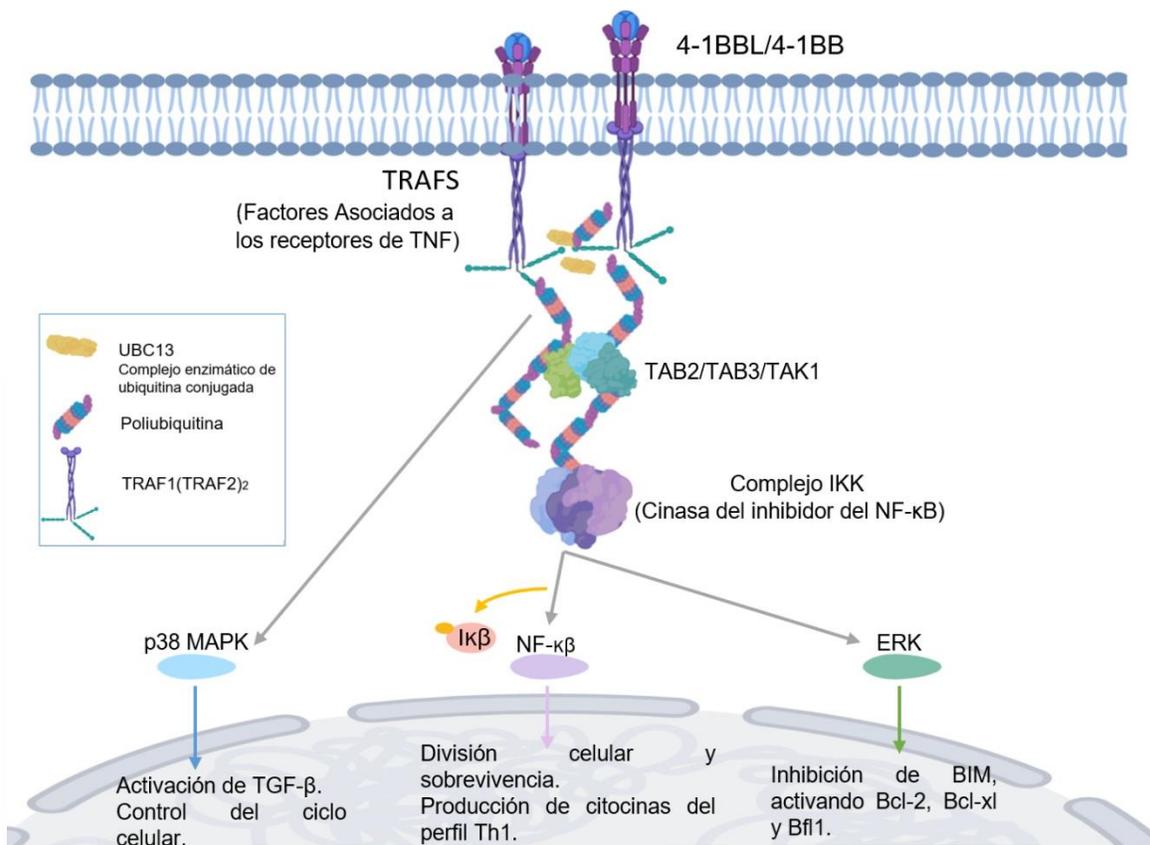


Figura 9. Ruta putativa de señalización para la activación de 4-1BBL dependiente de TRAF. Se da la formación de un dímero entre los dominios de las moléculas de TRAF-2 de trímeros adyacentes, que activan a las poliubiquitinas y al reclutamiento del complejo TAK1/cinasa activada por TGF-β (TAB) 2/TAB3. La fosforilación de IKK-β mediada por K-63-TAK1 activa al complejo IKK, lo que activa una cascada de señalización que resulta en la activación de las rutas p38 MAPK, NF-κB y ERK (Modificada de Zapata y col., 2018). Creada con BioRender.com

1.4 La proteína recombinante SA-4-1BBL

La estreptavidina (SA) es una proteína tetramérica (Pahler y col. 1987) neutra, conformada por subunidades homólogas no glicosiladas, la cual fue aislada de la bacteria *Streptomyces avidini* (Bayer y col., 1986). La proteína SA tiene la característica de unirse fuertemente a la biotina de forma similar a la glicoproteína del huevo avidina (Argaña col., 1986). Gracias a esta característica la SA se ha utilizado como herramienta biotecnológica en inmunoensayos, hibridación, activación de linfocitos, inmunoterapia, localización de

antígenos, cromatografía de afinidad, etc. (Bayer y col., 1989; Brower, y col., 1985; Cartun y col., 1989, Moxley, 1989).

Además de la función de unión a biotina, la estructura de la SA al formar tetrámeros y oligómeros estables en condiciones fisiológicas (Grakoui y col., 1999), permite la generación de proteínas quiméricas, funcionando como chaperona generando proteínas multiméricas (Kilinc y col., 2006) (Fig. 10).

Este péptido quimérico SA-4-1BBL se generó al fusionar la porción extracelular del 4-1BBL a la parte C-terminal de la forma modificada del core de la SA en el vector PMT/BiP/V5-HisA (Elpek y col., 2007). La molécula SA-4-1BBL existe como tetrámero/oligómero, debido a las características estructurales de SA, con una gran actividad co-estimuladora. La proteína quimérica en su forma soluble impulsa la proliferación de las células CD4+ y CD8+ en ensayos de proliferación *in vitro* (Schabowsky y col., 2009; Xie y col., 2010; Madireddi y col., 2012).

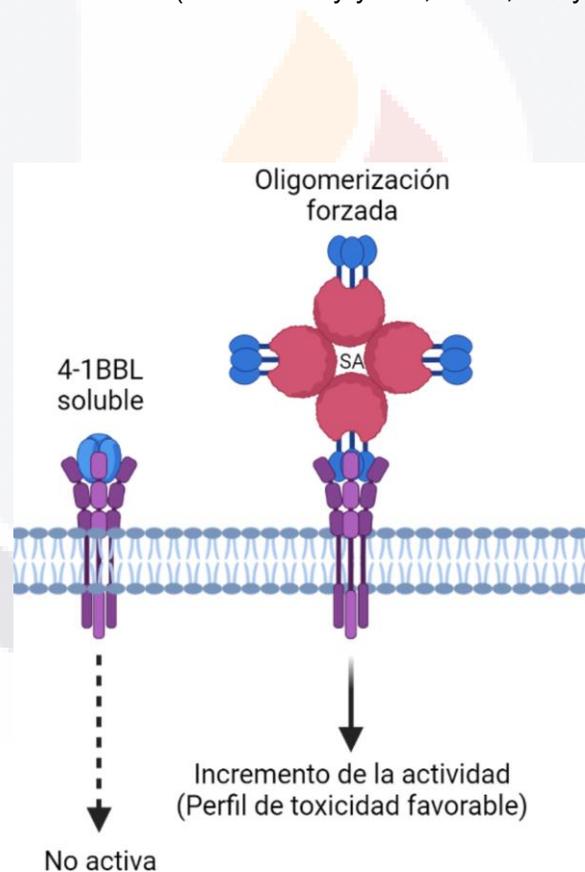


Figura 10. Estructura molecular de la proteína recombinante SA-4-1BBL. 4-1BBL soluble o 4-1BBL hexamérico es esencialmente inactivo. Sin embargo, la oligomerización forzada usando SA-4-1BBL permite la activación de 4-1BB induciendo un perfil de toxicidad favorable en la células inmunes con actividad citotóxicas (Modificada de Bremer, 2013). Creada con BioRender.com

Sharma y col. (2009) demostraron que la proteína soluble SA-4-1BBL es un inmunomodulador efectivo al activar por un lado DCs, favoreciendo su maduración, incrementando la expresión de moléculas co-estimuladoras y mejorando la captación del antígeno, y por otro al estimular la respuesta primaria de células T, manteniendo la memoria celular y provocando que las células T_{eff} superen el efecto supresor de las células T_{reg} $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ en el microambiente tumoral.

1.5 Sistemas de expresión procariontes

La producción de proteínas recombinantes en los sistemas de expresión procariontes y eucariontes son utilizados por la industria por varias ventajas, esto dependiendo del tipo de proteína, la tasa de crecimiento, el tipo de cultivo, nivel de expresión génica y procedimientos postraduccionales de la proteína sintetizada. El sistema mayormente utilizado para la sobreproducción de proteínas recombinantes es el sistema procarionte. Los componentes principales para la expresión de proteínas recombinantes son el vector y el organismo de expresión (Porowińska y col., 2013).

Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosómico de doble cadena, generalmente circular, que funcionan como vectores de expresión. Estos están de forma natural en el citoplasma de las bacterias y pueden replicarse de forma independiente al cromosoma bacteriano gracias a una secuencia llamada Ori (Lara, 2011). Gracias a la ingeniería genética se han utilizado estas moléculas autónomas para la generación de proteínas recombinantes, las cuales son útiles en el campo de la industria y la medicina. Existen diferentes tipos de vectores de expresión, diseñados a partir de los plásmidos, los cuales se adaptan a las necesidades de la proteína a producir y del productor hospedero (Fig. 11) (Porowińska y col., 2013).

Independientemente del tipo de proteína que se quiera producir, un vector debe de tener los siguientes elementos:

- Un replicón (Ori)
- Marcador de selección o gen de resistencia a antibiótico
- Sitio de clonación múltiple (polylinker)

- Gen promotor
- Sitio de unión al ribosoma
- Terminador de la transcripción

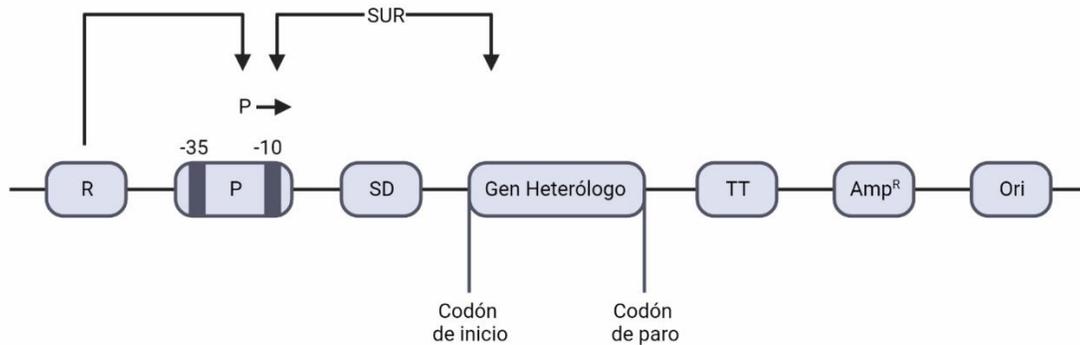


Figura 11. Estructura general de un vector de expresión bacteriano. En esta imagen se muestra al promotor Tac. El gen regulador (R) ejerce su efecto sobre el promotor (P), cuyas secuencias -10 y -35 están separadas por un espaciador de 17 bases. La flecha indica la dirección de la transcripción. El sitio de unión a ribosoma (SUR) consiste en la Shine-Dalgarno (SD) seguida de un espaciador que contiene nucleótidos AT de aproximadamente 8 pares de bases, que preceden al gen heterólogo. La secuencia del gen de transcripción (TT) se requiere para la estabilizar el RNA mensajero (mRNA). La resistencia a antibiótico, como la ampicilina (Amp^R) facilita la selección de células transformadas. Ori, representa el origen de replicación del vector (Modificado de Lara, 2011). Creada con BioRender.com

El tamaño de un plásmido es muy variable, y de preferencia deben ser vectores con un alto número de copias según sea un vector de clonación o uno de expresión. El número de copias está en función al origen de replicación del plásmido, aunque también las condiciones del cultivo y el estado fisiológico de la bacteria pueden influir sobre el número de copias (Sayadi y col., 1989). Las secuencias Ori se han modificado para obtener un mayor número de copias, como en el vector pMBI (de la familia de plásmidos pUC), para poder aumentar la producción de proteína recombinante. Sin embargo, una gran cantidad de copias puede implicar una carga metabólica importante a la célula (Terpe, 2006), como una cantidad grande de mRNA puede llevar a la destrucción de ribosomas y muerte celular (Baneyx, 1999). Un número menor de copias del vector pUC puede llevar mejores rendimientos en la producción de la proteína (Jones y col., 2000). La mayoría de los vectores de expresión tienen un ori ColE1 o p15A (Baneyx, 1999; Nuc y Nuc, 2006). ColE1 se utiliza en vectores como el pET (15-20 copias por célula) y el vector pUC da entre 500 a 700 copias por célula (Sørensen, 2010).

Un promotor en estos sistemas se debe seleccionar dependiendo de su naturaleza, fuerza, capacidad de controlar la expresión, la composición y el costo de la inducción, además de su compatibilidad con la cepa bacteriana que se utilizará (Prior y col., 2010). El promotor que se utiliza más en la industria es el pL/pR del fago lambda. Este promotor está regulado por la proteína cl857, la cual impide de forma eficiente la transcripción de genes a una temperatura entre 37°C hasta los 42°C, gracias a su termolabilidad (Valdez y col., 2009). También hay promotores que se manejan a bajas temperaturas, los cuales se operan a temperaturas óptimas para el crecimiento de *E. coli* (37°C), y al alcanzar la densidad deseada, la temperatura se reduce a 20°C, lo cual es la ideal para la actividad máxima. La solubilidad del oxígeno también aumenta a temperaturas más bajas, lo que ayudaría a mantener cultivos con altas densidades celulares. Además, a bajas temperaturas disminuye la velocidad de traducción, por lo que el plegamiento es más lento y se formarían mejor las proteínas, evitando menor formación de cuerpos de inclusión (Lim y col., 2000).

El gen heterólogo se debe optimizar en su secuencia para poder ser expresado en la célula, lo cual consiste en codones que sobre expresan RNA de transferencia poco comunes. Esto permite que al producir el mRNA, que por lo general es una molécula que se degrada fácilmente, en especial en *E. coli*, tenga una vida media más larga (Wang y col., 2004).

El vector de expresión posee un gen que proporciona resistencia a antibióticos. Esto permite emplear un protocolo de selección para poder conservar sólo a las bacterias transformadas o que poseen el vector (Lara, 2011).

Para la selección de la cepa es importante considerar aspectos cinéticos, genotípicos y fenotípicos, en los cuales se presenten tasas de mutación muy bajas. En estos sistemas se utiliza principalmente la bacteria *E. coli*, específicamente derivados de *E. coli* K-12 y B. Los sistemas procariontes permiten obtener grandes cantidades de proteína recombinante en un periodo de tiempo muy corto. La *E. coli* es un organismo muy barato de crecer mantener, además de que ya se tienen bien estudiados sus mecanismos de transcripción y traducción (Lara, 2011; Gopal y Kumar, 2013).

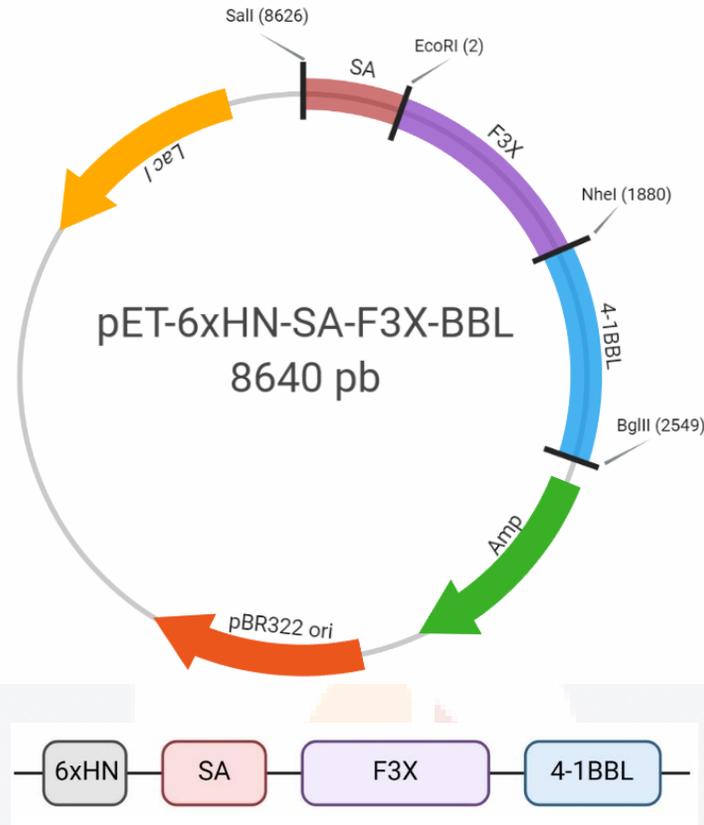


Figura 12. Esquema de la proteína recombinante SA-F3X-4-1BB en el plásmido y linearizada. La proteína recombinante diseñada para la vacuna contra el RSV consta de: una cadena de histidinas y lisinas (6xHN) para la purificación en columna de níquel. El core de estreptavidina SA, el cual tetrameriza a la molécula co-estimuladora 4-1BBL. La secuencia F3X es la proteína inmunogénica del RSV, concretamente la proteína de fusión F, la cual está en 3 tándem del sitio II. Por último, incluye la proteína co-estimuladora 4-1BBL. Creada con BioRender.com

Por lo que, en este trabajo, se realizó la producción de la proteína SA-F3X-BBL a partir de un vector pET-6xHN que contiene al core de estreptavidina, el epítipo inmunodominante que se encuentra en el sitio II de la proteína F del RSV (Fig. 6) en tándem de 3 como antígeno y la molécula co-estimuladora 4-1BBL (Fig. 12) a partir de un sistema procarionte. Como se ha mencionado anteriormente, la presentación antigénica es un punto crucial en la activación de los linfocitos T y en ella juega un papel crucial la CPA, como DCs y macrófagos. Un estudio importante a realizarse para probar la actividad biológica de la proteína SA-F3X-BBL es evaluar *in vitro* sus propiedades activadoras en las CPA, estimulando los mecanismos de señalización de estas células que promueven su acción como CPA en la activación de linfocitos T y su diferenciación hacia un perfil tipo 1 antiviral.

CAPÍTULO II

JUSTIFICACIÓN



2. JUSTIFICACIÓN

El RSV es una de las etiologías de las infecciones del tracto respiratorio bajo (ITRB) y está asociado a más de 199,000 muertes cada año en niños y se han reportado hasta 3.4 millones de hospitalizaciones al año. Por la gran variabilidad genética del virus, actualmente existen tratamientos con efectos secundarios y/o poco accesibles, por lo que el desarrollo de vacunas recombinantes que puedan potenciar la respuesta del sistema inmune es una estrategia prometedora contra la infección del RSV. Sin embargo, algunas vacunas que se han desarrollado muestran un pobre efecto protector, y más aún, algunas otras promueven la generación de una respuesta inmune que exacerba los síntomas en infecciones posteriores. Por ello es necesario probar vacunas en cuyo diseño se busca la polarización de la respuesta inmune hacia un perfil tipo 1 antiviral. En este sentido, la proteína recombinante abordada en este proyecto, SA-F3X-BBL, se presenta como una vacuna candidata que puede poseer esa propiedad, sin embargo, es imperante demostrar su capacidad co-estimuladora sobre CPA.

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS



3. HIPÓTESIS

La proteína recombinante SA-F3X-BBL producida y purificada de un sistema procarionte promueve la proliferación y activación diferencial de CPA, para el desarrollo de una respuesta inmune tipo 1 antiviral.



CAPÍTULO IV

OBJETIVOS

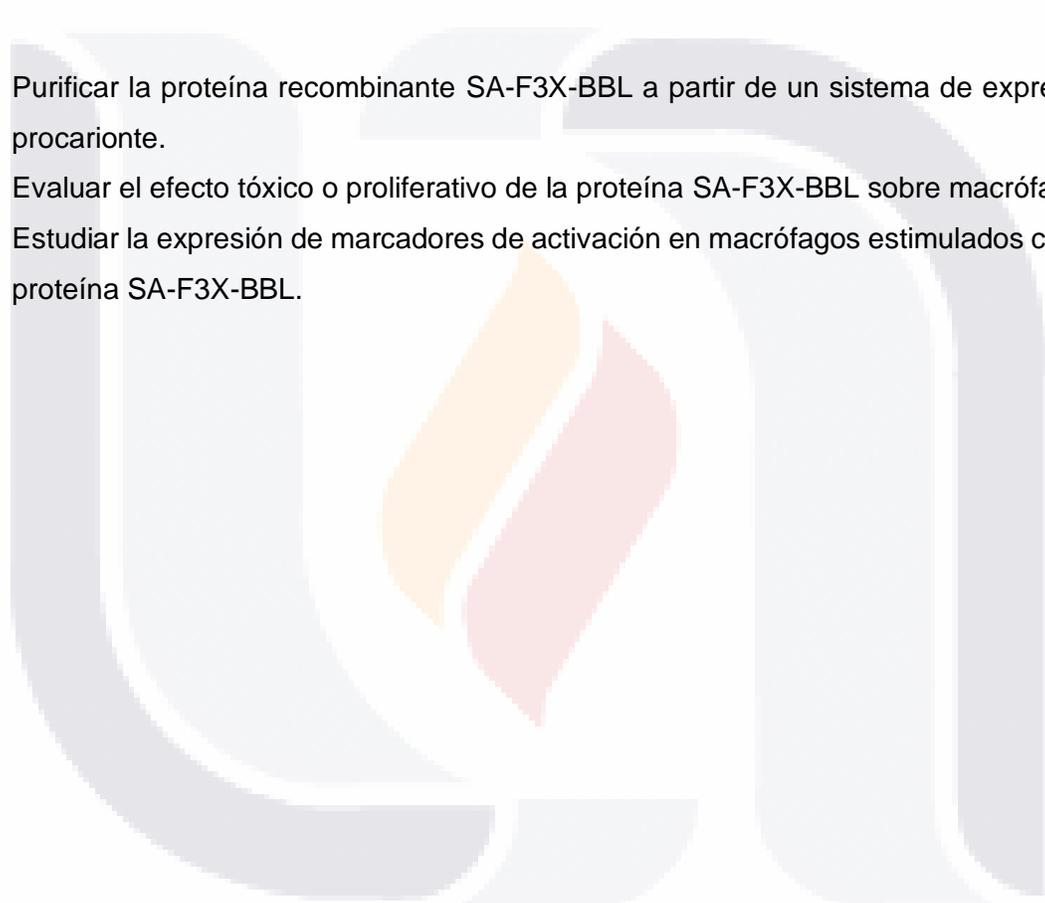


4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos biológicos, benéficos y adversos, de la proteína recombinante SA-F3X-BBL sobre macrófagos en ensayos *in vitro*

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Purificar la proteína recombinante SA-F3X-BBL a partir de un sistema de expresión procarionte.
- Evaluar el efecto tóxico o proliferativo de la proteína SA-F3X-BBL sobre macrófagos
- Estudiar la expresión de marcadores de activación en macrófagos estimulados con la proteína SA-F3X-BBL.



CAPÍTULO V

METODOLOGÍA



5. METODOLOGÍA

5.1 Purificación de la proteína.

5.1-1 Extracción del plásmido

Se realizó la extracción del vector de expresión pET6xHN-SA-F3X-4-1BBL (Secuencia F3X sintetizada en GeneScript y Secuencia SA-4-1BBL donada por el Dr. Roberto Montes de Oca de la Universidad Autónoma de Nuevo León, las cuales se utilizaron para el diseño del vector final en un proyecto previo) de las células *E. coli* DH5 α transformadas (Fig. 12). Se tomaron 2 mL de un cultivo transformado y se centrifugó a 14,000 rpm (10,976 g) por 3 minutos (min), se descartó el sobrenadante, los botones se resuspendieron con 250 μ L de la solución GTE (Glucosa, 50 mM; Tris-HCl, 25 mM; EDTA, 10 mM). Después se colocaron 300 μ L de la solución de lisis alcalina (SDS 2%, NaOH 0.4 N), se dejó incubando a temperatura ambiente (TA) por 5 min y se agregaron 250 μ L de la solución alta en sales (Acetato de potasio, 5 M; Ácido acético glacial, 2 M) dando inversión fuerte a la muestra. Se dejó incubar por 10 min a -20°C para centrifugar después a 14,000 rpm (10,976 g) por 5 min, se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo de 1.5 mL y se agregaron 700 μ L de isopropanol frío dando inversión fuerte. Se incubaron las muestras 10 min a -20 °C, se centrifugó a 13,000 rpm (9464 g) por 5 min, se descartó el sobrenadante y se agregaron 500 μ L de EtOH frío al 70%, se despegaron las pastillas y se volvió a centrifugar a 13,000 rpm (9464 g) por 3 min. Por último, se descartó el sobrenadante y se dejó secar en termo-block a 60°C por 10 min o hasta que estuviera completamente libre de etanol. La pastilla se resuspendió en 30 μ L de H₂O libre de nucleasas.

5.1-2 Transformación de *E. coli* C43

En un matraz con 50 mL de medio LB estéril (Tryptona, 1%; Extracto de levadura, 0.5%; NaCl, 1%) se inoculó 1 mL de cultivo criopreservado de *E. coli* C43 (DE3) y se dejó en agitación a 37°C hasta alcanzar una OD de 0.4 – 0.6. Se colocaron en hielo por 10 min para

detener su crecimiento y se repartió el cultivo en 4 tubos Corning de 15 mL para después centrifugarse a 5,000 rpm (6202 g) por 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 5 mL de CaCl₂ 0.1 M para incubarse en hielo por 1 h a 4°C. Los tubos se centrifugaron a 5,000 rpm (6202 g) por 5 min a 4°C. Por último, se descartó el sobrenadante y las 4 pastillas se resuspendieron en 500 µL de CaCl₂ 0.1 M. En un tubo de 1.5 mL se añadieron 10 ng del vector previamente extraído: pET6xHN-SA-F3X-4-1BBL más 100 µL de bacterias calcio-competentes, incubando por 1 h en hielo a 4°C. En seguida se realizó el choque térmico colocando las bacterias con el vector por 1 min en agua a 42°C e inmediatamente se colocan en hielo por mínimo 2 min. Se añadió 1 mL de medio LB para recuperar a las bacterias y se incubaron 1 h a 37°C en agitación. Se centrifugaron a 13,000 rpm (9464 g) por 3 min, se descartó el sobrenadante y el medio remanente se utilizó para resuspender la pastilla. El cultivo transformado se vertió en una placa sólida de agar LB suplementado con ampicilina (Amp) 100 µg/mL y se incubó a 37°C toda la noche.

5.1-3 Inducción de producción de las proteínas SA-F3X-BBL

De las colonias que se obtuvieron se tomaron con un asa varias de ellas y se inocularon individualmente en un tubo de fermentación con 4 mL de medio LB suplementado con Amp 100 µg/mL para dejarlas crecer toda la noche. Para confirmar la presencia del vector con el fragmento de interés se realizó una extracción del vector, como se describió en el apartado 5.1-1 y se realizó una reacción de PCR con un volumen final de 10 µL, utilizando los siguientes oligonucleótidos:

Fw-F3x: GTCGACATGGAAGTCCGATTCTGAAGAC ó

Fw-41BBL: GCTAGCGCTGAAGCTGCAGCTAAAG y

Rv-41BBL: AGATCTTCATTCCCATGGGTTG

con las siguientes condiciones de amplificación: 94°C, 3 min; 94°C, 30 s; 55°C, 30 s; 72°C, 2.5 min; 72°C, 3 min por 35 ciclos en un termociclador Applied Biosystems™ (2720 Thermal Cycler). Los fragmentos fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE (Tris base 40 mM, Ácido acético 20mM EDTA 1mM) 1x a 80 V. Una vez identificada la colonia transformada con el vector pET6xHN-SA-F3X-4-1BBL caracterizado, se inoculó 1 mL de esa colonia en un matraz de 80 mL de medio LB suplementado con Amp 100 µg/mL. Para el control negativo se inoculó 1 mL de la bacteria sin transformar en un medio sin Amp. Los cultivos se incubaron a 37°C en agitación hasta que alcanzaron una O.D. de 0.4-0.6, en la

cual se comienza la inducción añadiendo 1 mM de IPTG (Se tomaron 10 mL de cultivo a las 24 h de la inducción).

5.1-4 Extracción y purificación de las proteínas SA-BBL y SA-F3X-BBL

Los 10 mL de cultivo inducido con IPTG obtenidos a las 24 h se centrifugaron inmediatamente a 5,000 rpm (6202 g) por 5 min a 4°C. Las pastillas se resuspendieron en 300 µL de buffer de lisis (NaCl, 140 mM; KCl, 2.7 mM; Na₂HPO₄, 10 mM; KH₂PO₄, 1.8 mM, PMSF 100µM; pH 7.3; Lisozima, 60 µg). La suspensión se recuperó en un tubo de 1.5 mL y se incubó por 30 min a 4°C en hielo. Después se sónico por 6 periodos de 10 seg con 30 de descanso al 50% de la potencia y se centrifugaron a 13,000 rpm (9464 g) 5 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante (proteínas de la fracción soluble) y en otro tubo el botón se resuspendió en 300 µL de buffer de lisis (proteínas de la fracción insoluble). La purificación de la proteína de interés se realizó empleando el kit His-Spin Protein Miniprep (Zymo) siguiendo las instrucciones del proveedor.

5.1-5 Identificación de la proteína SA-BBL y SA-F3X-BBL

Para la identificación de la proteína recombinante, las muestras purificadas fueron cuantificadas por medio del método de Bradford. Se preparó una curva patrón a partir de una solución madre de albúmina de 1 mg/mL. Se cargaron en las placas 5 µL de muestra. 95 µL de agua y 250 µL de reactivo de Bradford (Azul de Commassie G 250 121 mM, Etanol 1mM, Ácido fosfórico al 85% 1mM) y se leyeron a 595 nm en un espectrofotómetro iMark Microplate Reader (BioRad). La concentración de proteína se calculó a partir de la ecuación de la recta arrojada por la curva de patrón de albúmina (Fig. 13).

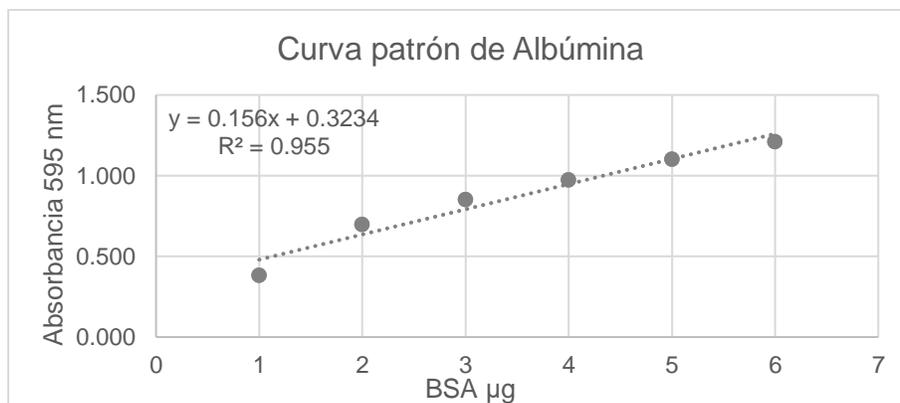


Figura 13. Gráfica de curva patrón de albúmina utilizada para la cuantificación de proteína por el método de Bradford con una n=4.

Se prepararon geles de acrilamida al 7.5% y se cargaron 20 µg de muestra en 20 µL de H₂O con 10 µL de buffer de muestra [Tris base, 1.5 M; upper buffer (Tris Base, 0.5 M; SDS 0.4%; pH 6.8), SDS, 10%; Glicerol, 2%; Bromofenol, 0.4%; β-Mercaptoetanol, 1%] cargando en total 30 µL de muestra. El gel se corrió a 80 V por 2 h. Después los geles se tiñeron con solución de tinción de azul de Commassie (Azul de Commassie G 250 1.5 mM, Metanol 50%, Ácido acético 1%) por 30 min en agitación a TA y se lavaron con una solución de desteñido (Metanol, 50 mL; Ácido acético, 10 mL; H₂O, 40 mL) por 1 h. Por último, se agregó H₂O al gel toda la noche a 4°C para revelar las bandas. Para el Western blot, los geles se transfirieron en una membrana de nitrocelulosa a 12 mAmp toda noche. La membrana se dejó secar y se lavó en metanol para después bloquearla con BSA al 5% en Tris-base (TBS) (NaCl, 0.5 M; Tris HCl, 0.02 M) por 2 h a TA con agitación. Para revelar la proteína de interés se utilizó el anticuerpo anti-F de RSV (2F7 anticuerpo IgG monoclonal de ratón contra la proteína F del RSV, Abcam #ab205719) diluido 1:500 en BSA al 5%, dejándose incubar a 4°C en agitación toda la noche. Después la membrana se lavó con H₂O por 5 min, Buffer TTBS (TBS + Tween 20, 0.2%) por 10 min 2 veces y TBS por 5 min. A continuación, se incubó 2 h con el anticuerpo secundario m-IgGκ BP-HRP (Anticuerpo secundario de unión a la cadena ligera κ de IgG de ratón conjugada con la peroxidasa de rábano picante, Santa Cruz Biotechnology sc-516102-CM) diluido 1:2,500 en BSA al 5% con TBS. Pasado el tiempo se lavó con TTBS por 15 min 2 veces, por 5 min 5 veces y se reveló con quimioluminiscencia (Luminol Clarity Western) para observar las posibles bandas de las proteínas SA-BBL o SA-F3X-BBL utilizando el equipo MicroChemi 4.2 (Bio-image Systems).

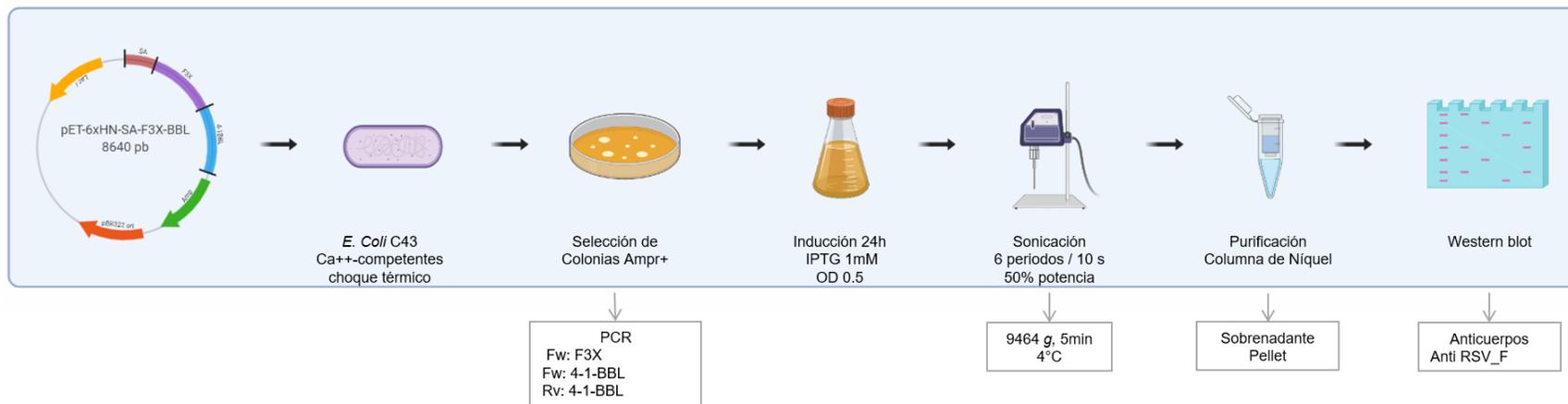


Figura 14. Modelo experimental para la producción e identificación de la proteína recombinante. Creada con BioRender.com

5.2 Establecimiento de la línea celular RAW 264.7

Se tomó el contenido de un vial de la línea celular RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) correspondientes a macrófagos murinos, para ser sembradas en 9 mL de DMEM suplementado [Dubelco's Modified Eagle Medium; Gibco, Grand Island, NY, USA 1x GlutaMax (Gibco), 90%; suero bovino fetal (SFB) inactivado, 10%; antibiótico (100 µg/mL de estreptomycin y 100 U/mL de penicilina, Sigma cat# P44582 mL), 2 %] en un tubo Corning de 15 mL. Se centrifugó a 1,000 rpm (248 g) por 9 min a 15°C. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió dando pequeños golpes al tubo. Se agregaron 5mL de DMEM suplementado al 10% a la pastilla resuspendida y se centrifugó nuevamente a 1,000 rpm (248 g) por 9 min a 22°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió dando pequeños golpes. Se le colocaron 3 mL de DMEM suplementado al 10% y se colocó en un frasco de cultivo celular Corning de 25 cm², colocando otros 2 mL de DMEM suplementado al 10%. El cambio de medio se realizó a las 72 h cuando se observó una confluencia del 40%. El pase celular se realizó cuando se observaba una confluencia del 60-70% y los ensayos se realizaron entre el 3er y 4to pase.

5.2-1 Activación de RAW 264.7 con LPS y reacción de Griess

Se sembraron en placas de 6 pozos 500,000 células RAW 264.7 por pozo, y cuando las células se encontraban en confluencia del 70% se realizó el estímulo de LPS. El LPS se colocó a una concentración 0, 0.5 y 1 µg/mL y el estímulo se dejó por 24 h. Después se agregaron 100 µL de reactivo de Griess (50 µl de reactivo A= ácido sulfanílico al 1% disuelto en ácido fosfórico más 50 µl de reactivo B= α- Naftilamina al 0.5% disuelto en ácido acético 5 N) a 100 µL de sobrenadante de cultivo celular y se dejó actuar por 2 min en una placa de 96 pozos. La reacción se leyó a 490 nm en un espectrofotómetro iMark Microplate Reader (BioRad). La concentración de nitritos orgánicos se cuantificó con 8 puntos de concentraciones decrecientes de NO₂⁻ en medio fresco (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56 y 0 µM) por medio de una curva estándar (Fig. 15).

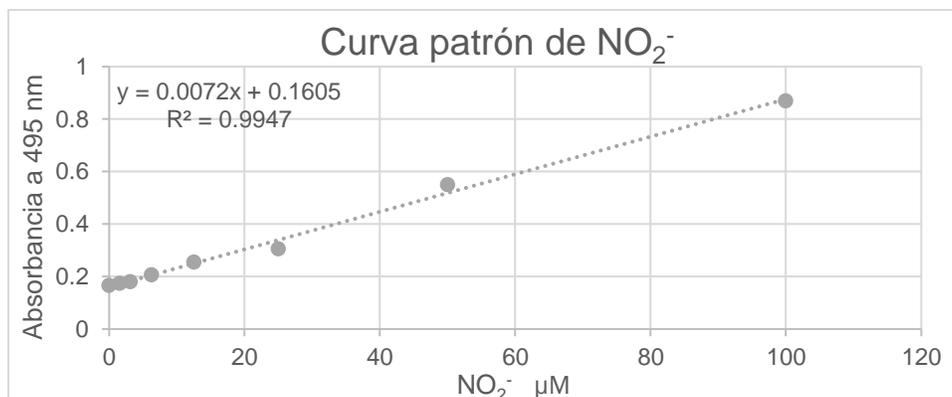


Figura 15. Curva patrón de NO₂⁻ para la cuantificación de nitritos orgánicos en la reacción de Griess, n=3.

5.3 Prueba de MTT

Para evaluar la viabilidad de la línea celular ante la presencia de la proteína recombinante en diferentes concentraciones se realizó la prueba de Bromuro de 3-(4,5- dimetiliazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (SIGMA, M2128). En una placa de 96 pozos se sembraron 100,000 células RAW 264.7 en 100 mL DMEM suplementado al 10% por pozo y se dejaron incubar por 24h a 37°C al 5% de CO₂. Después se agregó la proteína SA-F3X-4-1BB a diferentes concentraciones por triplicado (0, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 5 y 10 μg/mL). La proteína recombinante se incubó por 24 y 48h en medio RPMI sin suplementar a 37°C al 5% CO₂. Posteriormente se retiró el medio y se colocaron 100 μL de MTT, dejándose reaccionar por 4 h. Por último, se solubilizaron los cristales de formazan formados con HCL-isopropanol 0.4 N y se analizó por espectrofotometría (Smart specTM PLUS, BIO-RAD) a 595 nm.

5.4 Respuesta de células RAW 264.7 en presencia de la proteína SA-F3X-BBL

Para el análisis de la respuesta de la línea RAW 264.7 en presencia de la proteína recombinante se sembraron en placas de 6 pozos 500,000 células RAW 264.7 en medio DMEM suplementado al 10%, dejándose incubar a 37°C con 5% CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 70% (aproximadamente 3 millones de células). Al alcanzar la confluencia

se colocaron diferentes concentraciones de la proteína recombinante por triplicado (0, 0.1, 0.5 y 1 µg/mL). La incubación se dejó por 24 y 48 h, retirando las células con raspador y procesándolas para la extracción de proteína total, microsomal (apartado 5.4-1) y de RNA (apartado 5.4-3).

5.4-1 Obtención de proteína total y fracción microsomal de RAW. 264.7

Células RAW 264.7 con o sin proteína recombinante SA-F3X-BBL durante el pase tres se despegaron del sustrato del frasco con un raspador y se centrifugaron a 1,000 rpm (248 g) por 9 min a 15°C. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en PBS 1x a 4°C para volver a centrifugar. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 50 µL de buffer RIPA (Tris base, 50mM; NaCl, 150 mM; Deoxicolato, 0.5%; SDS, 0.1%; Triton X-100) por cada 700,000 células. Las células con RIPA se incubaron por 30 min a 4°C con agitación. Después se centrifugaron a 12,000 rpm (8,736 g) por 20 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y la proteína se almacenó a 4°C. Para la obtención de la fracción microsomal y tras los lavados, la pastilla de células se resuspendió en 500 µL de buffer de sonicación (Tris HCl 50 mM, EGTA 1mM, inhibidor de proteasas 2 mM; pH 7.2) por cada 5×10^6 células. Las células se sonicaron por 2 periodos de 10 seg al 30% de potencia, dejando 1 min entre cada sonicación (Cole Parmer Ge 130pb Ultrasonic Processor). Después se ultracentrifugaron a 61859 rpm (150,000g) 30 min a 4°C en una ultracentrífuga refrigerada Optima™ MAX-XP Ultracentrifuge (Beckman Coulter). Por último, se descartó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla en 100 µL de buffer de sonicación y fueron almacenadas a 4°C.

5.4-2 Evaluación de las vías de señalización

Después de la obtención de la proteína total y fracción microsomal (apartado 5.2-2) de las células estimuladas con la proteína recombinante (apartado 5.4) se evaluaron diferentes proteínas involucradas en la vía de señalización de 4-1BB/41-BBL. Las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida al 13.5% en las mismas condiciones que en apartado

5.1-5 (la proteína de la fracción microsomal se utilizó sólo para las muestras del anticuerpo CD-137 y se corrió en un gel de poliacrilamida al 10.5%). Para el Western blot, los geles se transfirieron en una membrana de nitrocelulosa a 12 mAmp toda la noche. La membrana se dejó secar y se lavó en metanol para después bloquearla con BSA al 5% en TBS toda la noche a TA en agitación. Para la identificación de las proteínas de interés se utilizaron los anticuerpos de la Tabla 1 diluidos en BSA al 5% y se siguió el protocolo descrito en el apartado 5-2.2. Los resultados se muestran como expresión relativa de cada proteína respecto a la expresión de β -actina y se calcula dividiendo la intensidad óptica integrada de la banda de la proteína de interés entre la intensidad óptica integrada de la banda de β -actina por medio del programa Image J.

Tabla 1. Anticuerpos de la vía de señalización y sus características.

Proteína	Descripción	Dilución	Tamaño (kDa)
β -actina	Anticuerpo de ratón monoclonal, clona AC-15, purificada de cultivo celular de hibrodoma. Especies: Cerdo, <i>Hirudo medicinalis</i> , bovino, rata, canino, felino, humano, conejo, carpa, ratón, conejillo de indias, pollo, oveja. A1978, Sigma Aldrich.	1:1,500	42 kDa
TRAF2	anticuerpo de ratón monoclonal dirigido contra los aminoácidos 1-249 de TRAF2 de origen humano. Especies: rata, ratón, humano. D-3: sc-136997, Santa Cruz Biotechnology.	1:500	50 kDa
p38 α/β	anticuerpo monoclonal dirigido contra los aminoácidos 213-360 de p38 α de origen humano no fosforilado. Especies: ratón, rata y humano. A-12: sc-7972, Santa Cruz Biotechnology.	1:500	38 kDa
p-p38 α/β	anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra el aminoácido Tir 182 de p-p38 α de origen humano. Especies: ratón, rata y humano. D-8: sc-7973, Santa Cruz Biotechnology.	1:500	38 kDa
I κ B- α	anticuerpo de monoclonal de ratón dirigido a los aminoácidos 1-317 de la proteína I κ B- α de origen humano. Especies: ratón, rata y humano. H-4: sc-1643, Santa Cruz Biotechnology.	1:1,000	42 kDa
p-I κ B- α	Anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra la Ser 32 fosforilada de I κ B- α de origen humano. Especies: ratón, rata y humano. (B-9): sc-8404, Santa Cruz Biotechnology.	1:500	41 kDa

<p>4-1BB (CD-137)</p>	<p>anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra la proteína recombinante CD137 de origen murino. Especies: Ratón. 6D295: sc-70530, Santa Cruz Biotechnology.</p>	<p>1:500</p>	<p>85 kDa</p>
---------------------------	--	--------------	---------------

5.4-3 Extracción de RNA y síntesis cDNA

Después de la estimulación a las 24 y 48 h (apartado 5.4), las células se recuperaron con un raspador en tubos de 2 mL (en hielo), y se centrifugaron a 11,000 rpm (9486 g) 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavaron con 500 µL PBS 1x para centrifugarse 11,000 rpm (9486 g) 3 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante para colocar 500 µL de Trizol (TRI reagent T-9424, SIGMA) a 4°C y se resuspendieron. Se dio vortex por 15 seg y se dejó reposar por 5 min a TA. Se agregaron 500 µL de cloroformo a 4°C y se dio vortex por 15 seg más, dejando reposar otros 5 min. Las muestras se centrifugaron a 6962 rpm (12,000 g) 10 min a 4°C para recuperar la fase acuosa en tubos de 1.5 mL. Se agregaron 250 µL de isopropanol frío y se mezclaron para ser incubadas en hielo por 5 min. Después se centrifugaron a 6962 rpm (12,000 g) 10 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y lavó la pastilla con etanol frío al 70% centrifugando a 6962 rpm (12,000 g) 5 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y las muestras se secaron por 10 min a 37°C. Por último, el RNA se resuspendió en 20 µL de agua libre de RNAsas y se guardó a -80°C hasta su uso.

El cDNA a partir de las muestras de RNA de la incubación se generó por medio del kit First Strand cDNA Syntehsis (Thermo scientific, #K1612). El RNA se cuantificó con un NANODROP (Thermo scientific) para utilizar la misma cantidad de RNA en la reacción de síntesis. Para cada reacción de síntesis de cDNA se utilizaron 4 µL de Buffer 5x, 1 µL de inhibidor de RNAsas, 2 µL de dNTPs, 2 µL de transcriptasa reversa y 10 µL de muestra con 1 µg de RNA con las siguientes condiciones de amplificación: 120 min, 37°C; 5 min; 70°C. Las muestras se guardaron a -80°C hasta su uso.

5.4-4 PCR punto final y tiempo real

Para la estandarización de los oligonucleótidos se realizó un mix de cDNA de todas las muestras para realizar una PCR punto final y se diluyó 1:10 para la reacción de PCR. Para

la reacción se utilizaron 5 µL de Buffer 2x, 3 µL de cDNA (15 ng) y 1 µL de oligonucleótido Forward (Fw) y Reverse (Rv) (Tabla 2), respectivamente (Reacción de 10 µL), con las siguientes condiciones de amplificación: 3 min, 94 °C, 30 s, 94°C; 30 s, 60°C; 5 min; 72°C, por 40 ciclos.

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en este trabajo

Gen	Oligonucleótidos	Tamaño (pb)	No. de acceso
β-actina	Fw: GGCATCCACGAAACTACCTT Rv: TACTCCTGCTTGCTGATCCA	269 pb	NM_001101.5
IL-12B	Fw: ATGTTGTAGAGGTGGACTGGAC Rv: GTGGAGCAGCAGATGTGAGT	224 pb	NM_001303244
IFN-γ	Fw: CTC AAGTGGCATAGATGTGG Rv: GCTGTTGCTGAAGAAGGTAG	205 pb	NM_008337.4
4-1BBL	Fw: ACTTGATGTGGAGGATACCGC Rv: CGAACATTAACCGCAGGGTA	177 pb	XM_006524033
4-1BB	Fw: AGCCGAACTGTAACATCTGC Rv: TAGAGAGCAGTTCGTCCAGG	251 pb	XM_011250228.3
Birc5	Fw: TGAATCCTGCGTTTGAGTCG Rv: TTCTCGGTAGGGCAGTGGAT	197 pb	NM_009689.2
Bcl2l11	Fw: CAGGAAGAGTATGGTGTGGCC Rv: TCTGAGGAGTTGAGGGAAGC	219 pb	NM_207680.2
TNF-α	Fw: CAACGGCATGGATCTCAAAG Rv: TTGACGGCAGAGAGGAGGTT	177 pb	NM_013693.3

Los fragmentos fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1x a 80 V. Para la PCR en tiempo real se utilizó la misma reacción de PCR punto final con el máster mix (2x) de Maxima SYBR Green/ROX (Thermo scientific, K0221) (Reacción de 10 µL) y las mismas condiciones de amplificación en un termociclador Applied Biosystems StepOne™. La cuantificación de la expresión génica se realizó por el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001), utilizando a la actina como control.

5-5- Análisis estadístico

Los datos se presentaron como la media ± desviación estándar de la media. Se realizaron análisis estadísticos de ANOVA con post-test multicomparativo de Bonferroni. Se consideró significativo si $p < 0.05$. El análisis se realizó con el Programa GraphPad Prisma versión 9.

CAPÍTULO VI

RESULTADOS



6.1 Producción de la proteína recombinante

La producción de la proteína SA-F3X-BBL se generó a partir del vector de expresión pET6xHN-SA-F3X-4-1BBL (Fig. 12). El vector se introdujo en células *E. coli* C43 por medio de choque térmico y se crecieron en medio LB sólido con Amp. Antes de la inducción de la producción, las colonias resistentes se crecieron individualmente en medio LB líquido con Amp toda la noche y se extrajo el DNA plasmídico. Se confirmó la presencia del vector por medio de PCR flanqueando la región F3X-4-1-BBL utilizando los oligonucleótidos Fw de F3X (GTCGACATGGAAGCTGCCGATTCTGAAGAC) y Rv de 41BBL (AGATCTTCATTCCCATGGGTTG), y también la región 4-1BBL con los oligonucleótidos Fw de 41BBL (GCTAGCGCTGAAGCTGCAGCTAAAG) y Rv de 41BBL (AGATCTTCATTCCCATGGGTTG). Las bandas de la PCR se observaron por medio de un gel de agarosa al 1%. En la figura 16 se muestra que efectivamente el vector se encontraba en las colonias seleccionadas, ya que las bandas observadas corresponden al fragmento 4-1BBL (Fig. 16, carril 1, 700 pb) y al fragmento F3X-4-1BBL (Fig. 16, carril 3, 2,500 pb) tomando como referencia al vector de inducción (Fig. 12).

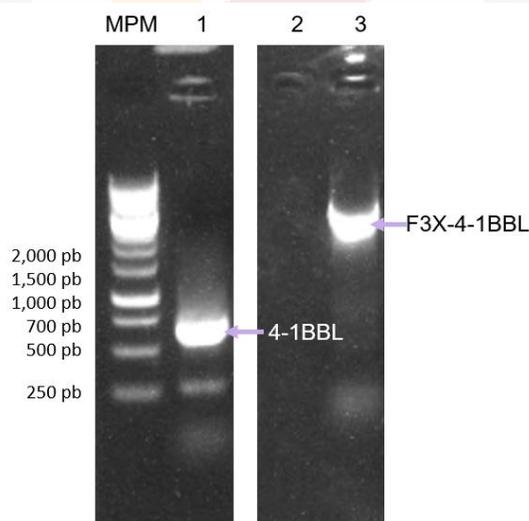


Figura 16. Electroforesis de la PCR de *E. coli* C43 transformadas con el vector de expresión pET6xHN-SA-4-1BBL. MPM) marcador de peso molecular de 1 Kb, carril 1) *E. coli* C43 pET6xHN-SA-4-1BBL con un fragmento de aproximadamente 600 pb correspondiente al fragmento de 4-1BBL, carril 2) Control negativo sin DNA, carril 3) *E. coli*. C43 pET6xHN-SA-F3X-4-1BBL con un fragmento de aproximadamente 2,500 pb correspondiente al fragmento F3X-4-1BBL.

Después de la caracterización de las clonas transformadas, estas se crecieron en medio LB líquido con Amp para la inducción de la producción de la proteína recombinante con IPTG 1mM por 24 h. La proteína total se extrajo por medio de sonicación y la fracción soluble fue purificada por medio de columnas de níquel. La proteína purificada se corrió en un gel de SDS-PAGE al 7.5% y después se realizó la transferencia en una membrana de nitrocelulosa para el western blot. Para identificar la proteína recombinante SA-F3X-BBL se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína F del RSV. La proteína recombinante SA-F3X-BBL tiene un peso molecular teórico de 109 kDa, el cual se calculó por medio de bioinformática (www.expasy.com/protparam). En la figura 17 se puede observar la banda de la proteína recombinante tanto en el gel SDS-PAGE que fue teñido con azul de coomassie (Fig. 17A) como en el western blot (Fig.17B) a la altura de 84.4 kDa en la fracción soluble purificada del extracto total de proteína (Fig. 17, flecha blanca). El peso molecular de la proteína recombinante se calculó graficando el logaritmo del peso molecular (kDa) versus el Rf de las bandas de referencia, extrapolando el Rf de la proteína recombinante. Se determinó un rendimiento de producción de proteína de 5.6%

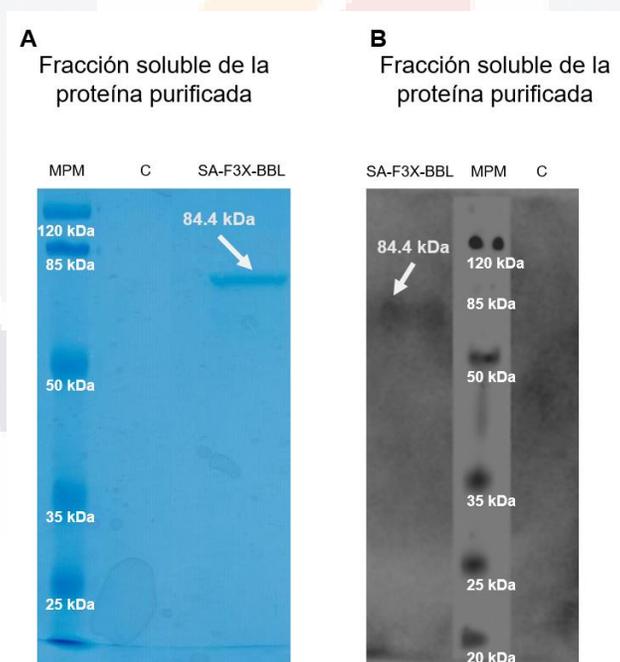


Figura 17. Fracción soluble purificada de los cultivos de *E. coli* expresando la proteína SA-F3X-BBL a las 24 h de inducción. A) Gel SDS-PAGE teñido con azul de coomassie, B) Western blot de la proteína SA-F3X-BBL. La flecha blanca indica la presencia de la banda a 84.4 kDa. MPM: Marcador de peso molecular, C: control de extracto soluble de la proteína purificada de las *E. coli* no transformadas.

6.2 Establecimiento de la línea celular RAW 264.7

Para poder evaluar la actividad biológica de la proteína recombinante SA-F3X-BBL se realizó una prueba de estimulación celular con LPS para estandarizar las proteínas de vías de señalización y la evaluación de viabilidad celular con diferentes concentraciones de proteína.

6.2-1 Activación de células RAW 264.7

Antes de evaluar la posible respuesta de las células RAW 264.7 a la proteína SA-F3X-BBL, se evaluó la capacidad de estas células para responder a un estímulo, por lo que se cuantificó la producción de nitritos en células RAW 264.7 al ser estimuladas con LPS. La reacción de Griess permite observar la formación de nitritos orgánicos en células activadas por un estímulo (Green y col., 1982). Se utilizó al LPS ya que este es una molécula ampliamente utilizada como un control positivo de interacción de RAW 264.7 (Ghosh y col., 2014; Yin y col., 2019; Park y Lee, 2020). Como se observa en la figura 18, las concentraciones de 0.5 y 1 µg/mL de LPS obtuvieron diferencias significativas en la formación de nitritos orgánicos, con un aumento de 52.28 y 41.4 veces contra el control, respectivamente, confirmando que la línea celular RAW 264.7 se activa ante un estímulo.

Estimulación de RAW 264.7 con LPS

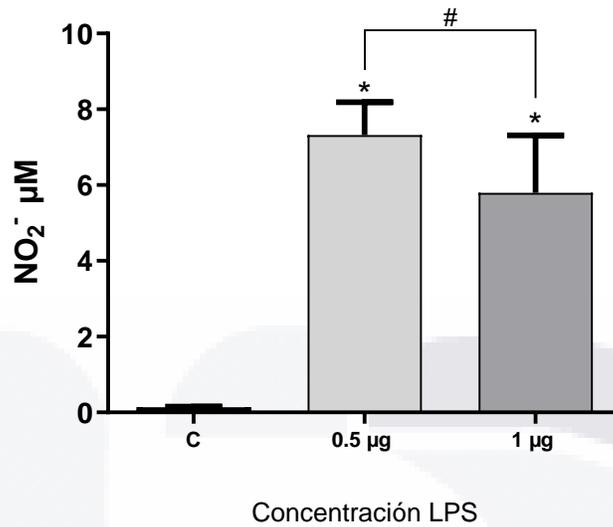


Figura 18. Reacción de Griess de la incubación de RAW 264.7 con LPS. ANOVA de una vía *post-hoc* Bonferroni *p<0.0001, vs Control (C), #p=0.0007 0.5 µg vs 1 µg/MI de LPS. n=6, dos ensayos independientes por triplicado.

6.3 Evaluación de la toxicidad de la proteína SA-F3X-BBL en células RAW 264.7

Para evaluar la toxicidad de la proteína recombinante sobre las células RAW 264.7 se empleó la prueba de MTT. El MTT permite evaluar la actividad metabólica de las células al interactuar con la proteína membranal succinato deshidrogenasa formando al compuesto formazan, de color morado-rojizo (Kumar y col., 2018). Este se evalúa por medio de espectrofotometría y la intensidad del color nos indica el porcentaje de supervivencia celular. En la figura 19, se observa el efecto de las diferentes concentraciones de la proteína recombinante a las 24 y 48 h de la incubación en células RAW 264.7. A las 24 h de incubación la concentración de 0.1 µg y 0.5 µg la proliferación celular sobrepasó el 100% (control) con valores de 103 y 102% respectivamente, sin llegar a ser este aumento significativo con respecto al control. Por el contrario, las concentraciones de la proteína recombinante de 1 y 2 µg disminuyeron la viabilidad celular a un 92 y 88% respectivamente, sin encontrarse diferencias significativas con respecto al control. Las concentraciones más altas de proteína recombinante (3, 5 y 10 µg) disminuyeron significativamente la viabilidad

celular a valores de 72, 17 y 2% respectivamente, lo que indica un efecto tóxico sobre estas células. En el caso de la incubación durante 48 h, se observó un comportamiento similar. En las concentraciones de 0.1, 0.5 y 1 μg la viabilidad se mantuvo cercana al 100% (93, 86 y 85, respectivamente) y sin diferencias significativas. Con la concentración de 2 y 3 μg de proteína se encontró una disminución significativa de la viabilidad a un 68 y 50% respectivamente, y en las concentraciones más altas se redujo a menos del 3%. Con estos resultados se establecieron las concentraciones de la proteína recombinante a utilizar en ensayos posteriores, definiendo 0.1, 0.5 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de SA-F3X-BBL, ya que con estas concentraciones se obtuvo un porcentaje de supervivencia de las células RAW 264.7 superior al 90% tras 24 y 48 h de incubación con la proteína recombinante. Además, las concentraciones probadas de SA-F3X-BBL no estimularon la proliferación celular de los macrófagos RAW 264.7.

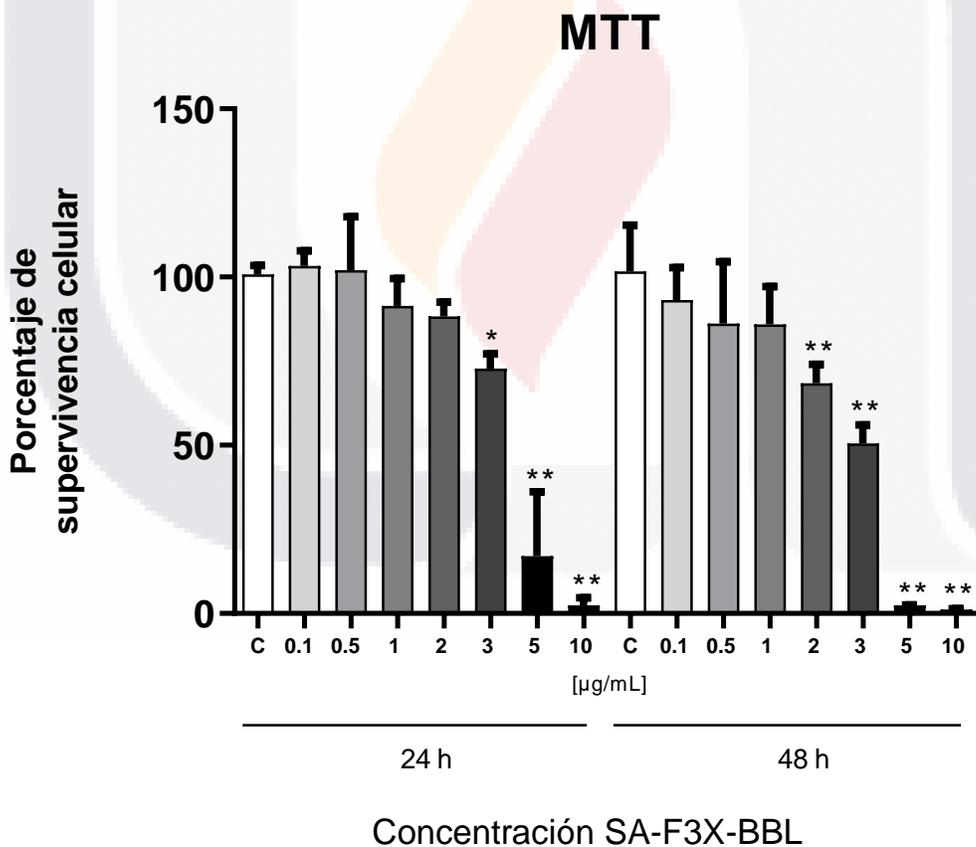


Fig. 19 Porcentaje de supervivencia de células RAW 264.7 con diferentes concentraciones de SA-F3X-BBL. ANOVA de una vía *post-hoc* Bonferroni * $p > 0.001$, ** $p > 0.0001$ vs Control, $n=6$, 2 ensayos independientes por triplicado.

6.4 Efecto biológico de la proteína SA-F3X-BBL en células RAW 264.7

Para poder evaluar el efecto biológico de la proteína recombinante, se estimularon células RAW 264.7 por 24 y 48 h con 0.1, 0.5 y 1 $\mu\text{g/mL}$ de la proteína recombinante SA-F3X-BBL y se extrajo proteína de la fracción microsomal de las células (membranas celulares) para el análisis del receptor CD137 (4-1BB), proteína total para el análisis de TRAF2 y de proteínas fosforiladas y no fosforiladas de p38 e I κ B, por medio de Western blot, utilizado como control de carga la β -actina. Además de la activación de la ruta de señalización involucrada en la respuesta de la incubación por 4-1BB, se analizó la expresión de algunos de los genes regulados por la vía de activación del señalosoma 4-1BB/4-1BB. La interacción de las células RAW 264.7 y la proteína recombinante se realizó bajo las mismas condiciones mencionadas, extrayendo RNAm a las 24 y 48 h para el análisis de los genes 4-1BB, 4-1BBL, TNF, IFN- γ , IL-12, BIRC5 y Bcl2l11 por medio de qPCR.

6.4-1. Proteínas de la vía de señalización

En la figura 20 se analizó la expresión de la proteína del receptor 4-1BB, cuyos niveles se aumentaron significativamente 2.2 veces en comparación con su control de 48 h al estimular las células RAW 264.7 con una concentración de proteína recombinante de 0.5 $\mu\text{g/mL}$. En la concentración de 0.1 $\mu\text{g/mL}$, el receptor presentó una tendencia de aumento en su expresión de 1.7 veces a las 24 h y 1.5 veces a las 48 h, pero no presentó diferencia significativa respecto a los correspondientes ensayos controles (Fig. 20).

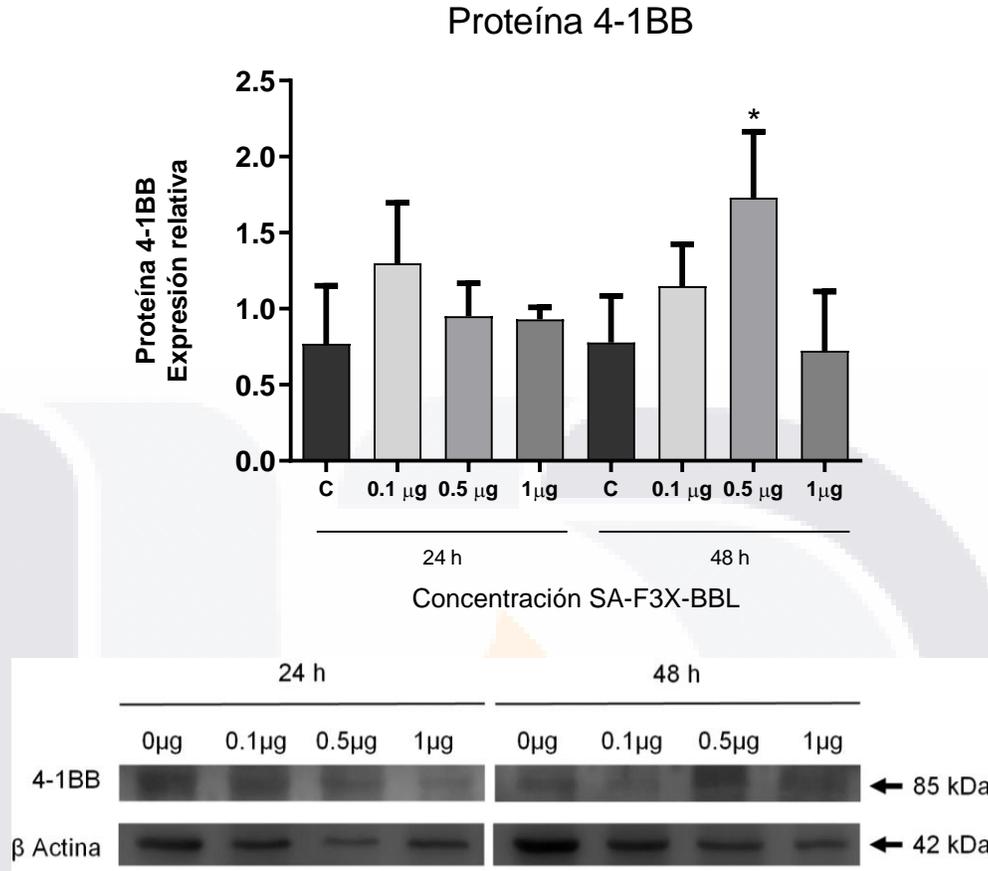


Figura 20. Expresión relativa de 4-1BB en la línea celular RAW 264.7 a diferentes concentraciones de SA-F3X-BBL. * $p < 0.01$ vs Control 48 h. ANOVA de una vía, *post-hoc* Bonferroni, $n=6$, dos ensayos independientes por triplicado.

El nivel de expresión de la proteína TRAF2 en células RAW 264.7 en presencia de la proteína recombinante se incrementó de manera significativa a las 24 h de la incubación en todas las concentraciones ensayadas de SA-F3X-BBL. La concentración de 0.1 µg/mL la aumentó 2.5 veces y las concentraciones de 0.5 y 1 µg/mL aumentaron su expresión 3.3 y 3.7 veces, respectivamente, en comparación con su control de 24 h. A las 48 h las concentraciones de 0.1 y 0.5 µg/mL también aumentaron 3 y 2.8 veces el nivel de expresión de la proteína, pero estos incrementos no fueron significativos respecto al control (Fig. 21).

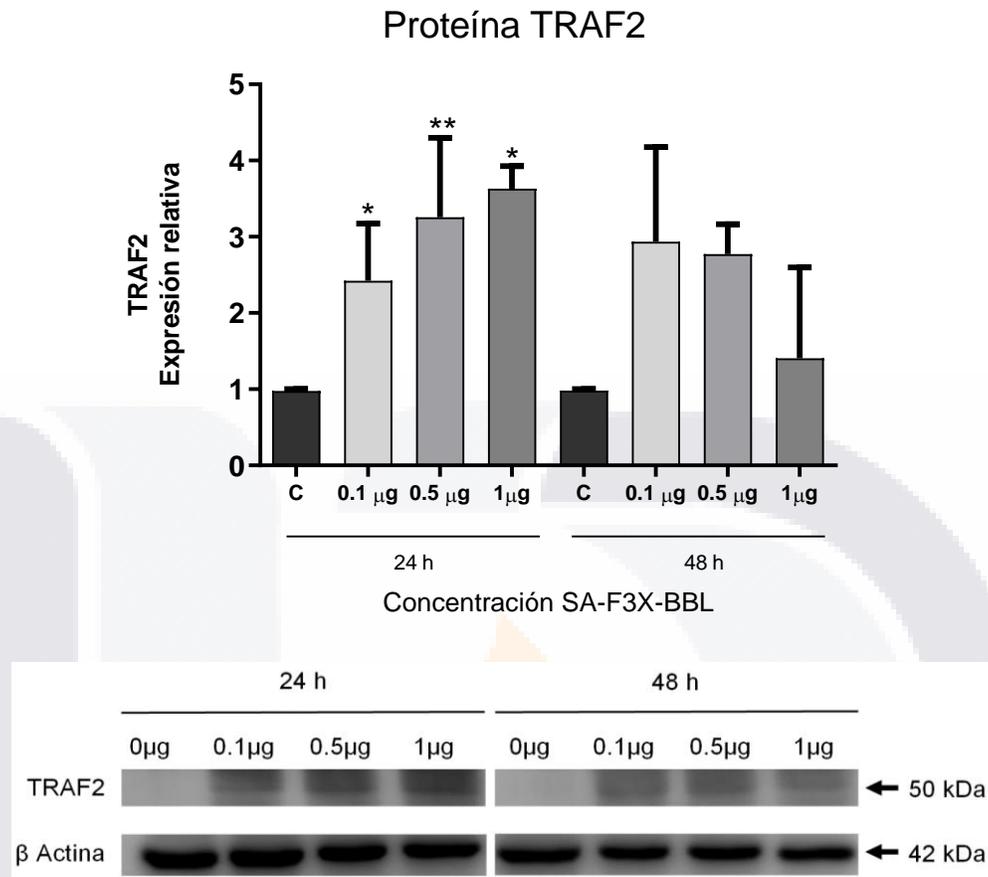


Figura 21. Expresión relativa de la proteína TRAF2 en células RAW 264.7 a diferentes concentraciones de SA-F3X-BBL. ** $p < 0.002$, * $p < 0.05$ vs su respectivo Control. ANOVA de una vía, *post-hoc* Bonferroni, $n=6$, dos ensayos independientes por triplicado.

Para poder observar la activación de las vías de señalización que ocurre después del reclutamiento de las proteínas de ensamblaje, se analizó la fosforilación de las proteínas p38 MAPK y la proteína I κ B en las células RAW 264.7. Para ello se evaluó el nivel de expresión de la proteína fosforilada en relación a la expresión de la proteína sin fosforilar. La proteína p38 presentó activación tras la incubación de las células con SA-F3X-BBL a las 24 y 48 h, al observarse un incremento significativo en la relación p38 fosforilada/p38 no fosforilada en todas las concentraciones de proteína recombinante ensayadas en comparación a su respectivo control, con excepción de la concentración de 1 μ g/mL a las 24h. La concentración que indujo el mayor aumento de expresión de la proteína fosforilada fue la concentración de 0.1 μ g/mL a las 24 h, aumentando su expresión 8.7 veces respecto a su control. La concentración de 0.5 μ g/mL a las 24 h la incrementó 4.9 veces y las de 0.1,

0.5 y 1 $\mu\text{g/mL}$ a las 48 h la elevaron 6.05, 6.2 y 6.3 veces respectivamente (Fig. 22). En el caso de la activación del factor de transcripción NF- κB se analizó la relación I κB fosforilada/I κB no fosforilada en células RAW 246.7 estimuladas o no con concentraciones crecientes de SA-F3X-BBL. Esta relación se aumentó significativamente sólo a la concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ a las 48h de la estimulación con la proteína recombinante, aumentando 1.8 veces respecto a su control (Fig. 23).

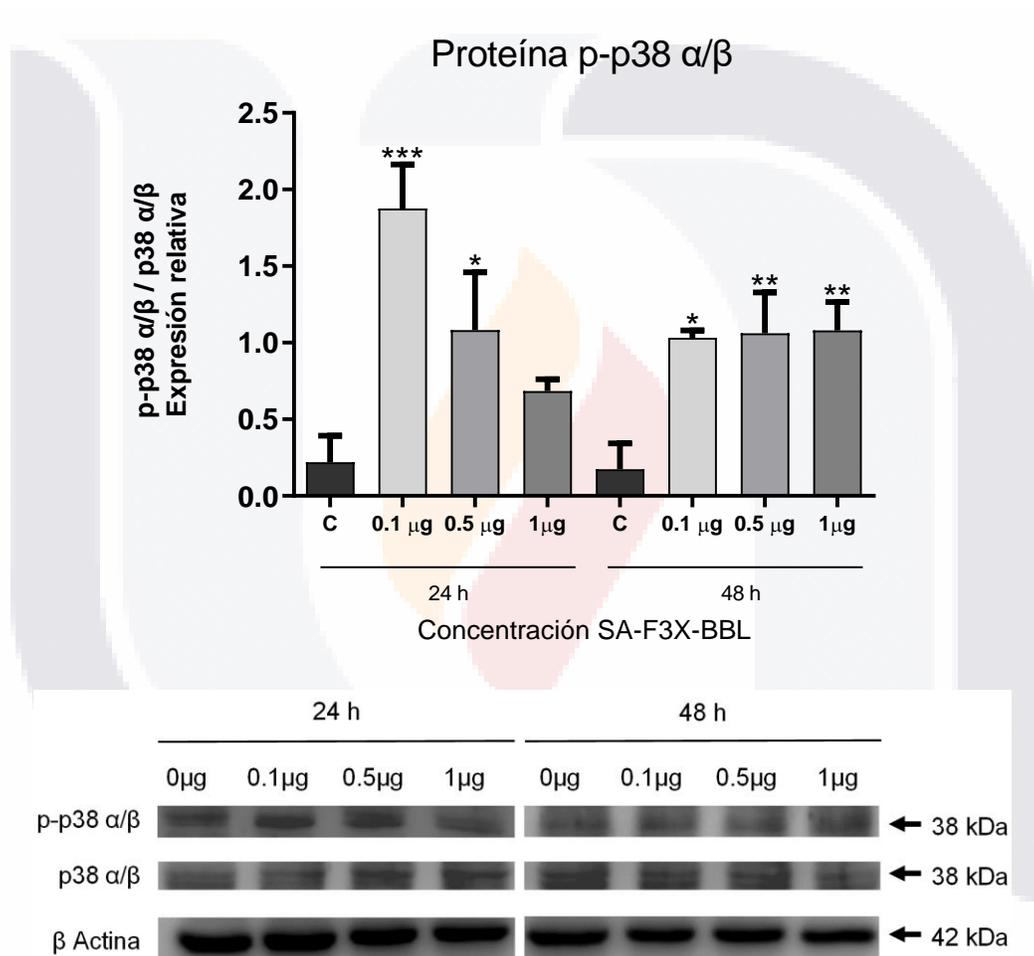


Figura 22. Expresión relativa del p-p38 en células RAW 264.7 a diferentes concentraciones de SA-F3X-BBL. *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ vs Control a su respectivo tiempo. ANOVA de una vía, *post-hoc* Bonferroni, $n=6$, dos ensayos independientes por triplicado.

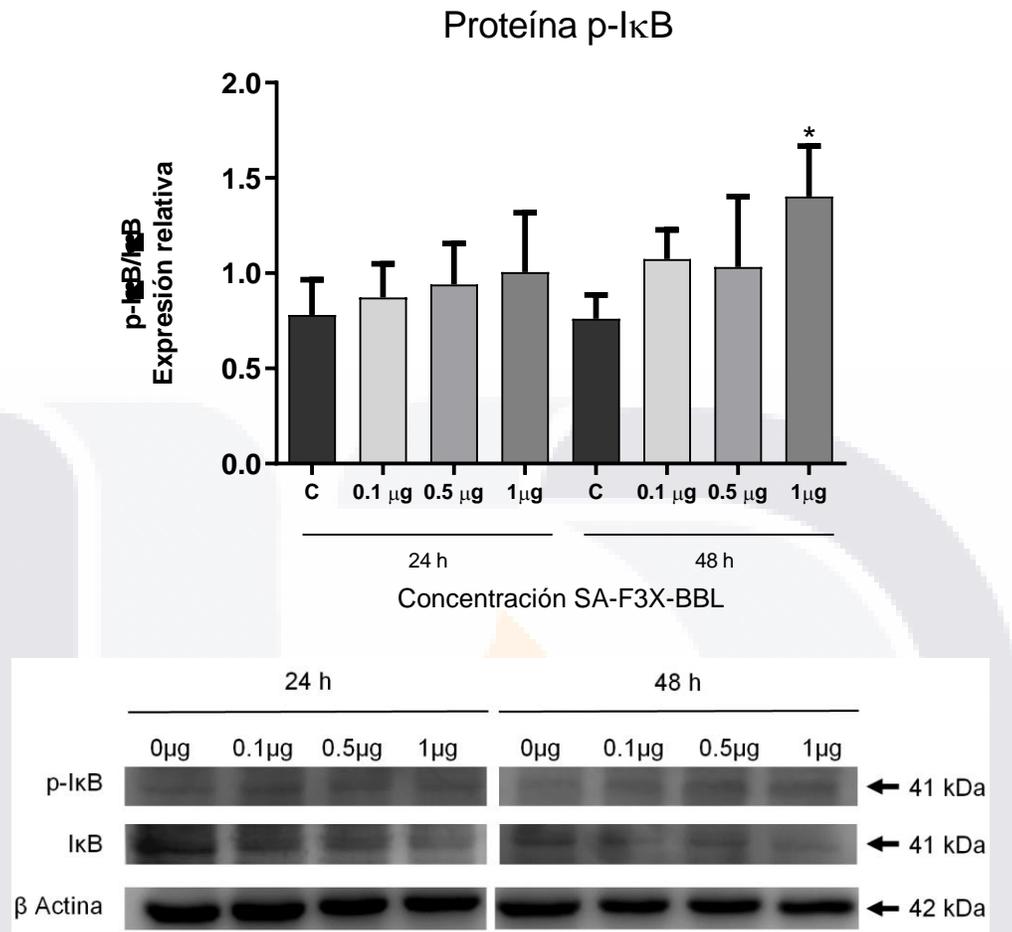


Figura 23. Expresión relativa del p-IκB en células RAW 264.7 a diferentes concentraciones de SA-F3X-BBL. * $p < 0.05$ vs Control 48 h. ANOVA de una vía, *post-hoc* Bonferroni, $n=6$, dos ensayos independientes por triplicado.

6.3-3. Inducción de la expresión genética en macrófagos RAW 264.7

La expresión del gen del receptor 4-1BB aumentó significativamente cuando las células se estimularon con la proteína recombinante a la concentración de 0.5 μg/mL a las 24 y 48 h, con incrementos de 29.6 y 39 veces respectivamente, en comparación a su respectivo control. Utilizando esta concentración de 0.5 μg/mL de SA-F3X-BBL, el incremento en la expresión del gen de 4-1BB fue significativamente mayor cuando las células se estimularon durante 48 h respecto al estímulo durante 24 h. También la expresión génica

de 4-1BB aumentó 15.2 veces a las 24 h con la concentración de 1 µg/mL y 11.6 veces con la concentración de 0.1 µg/mL a las 48 h (Fig. 24).

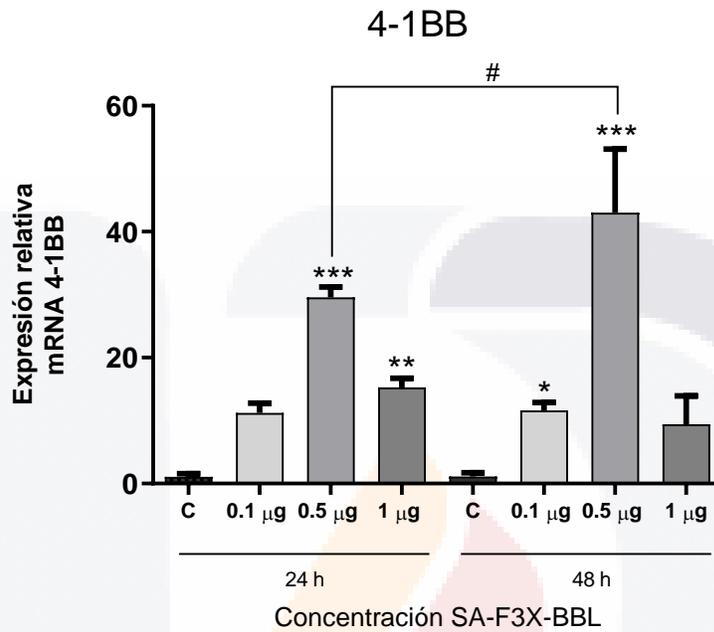


Figura 24. Expresión relativa del gen 4-1BB en células RAW 264.7 a diferentes concentraciones de SA-F3X-BBL. *** $p < 0.0001$; ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs su respectivo Control; # $p < 0.01$. ANOVA una vía, *post-hoc* Bonferroni, $n = 6$, dos ensayos independientes por triplicado.

También se analizó la expresión del gen del 4-1BBL en las células RAW 264.7 en respuesta a la proteína SA-F3X-BBL, el cual solo presentó un pico de aumento que fue 4.3 veces más alta contra su control en la concentración de 0.5 µg/mL a las 48 h de la estimulación (Fig. 25).

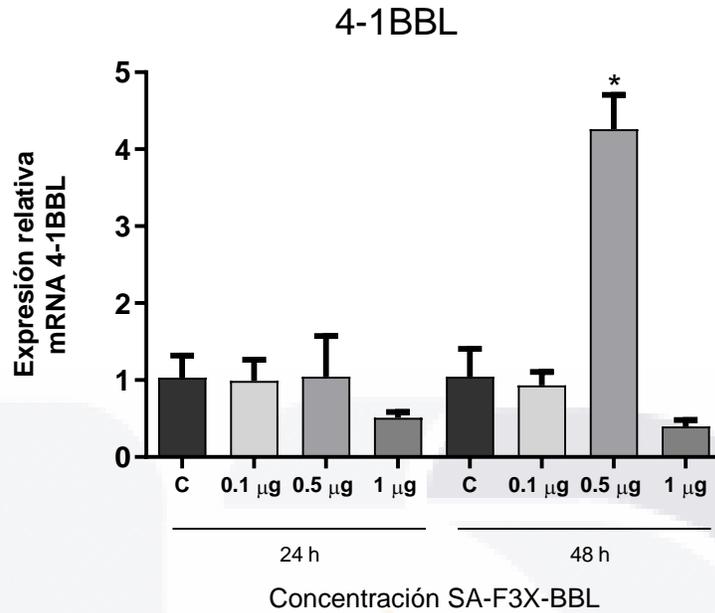


Figura 25. Expresión relativa del gen de 4-1BBL en células RAW 264.7 a diferentes concentraciones de SA-F3X-BBL. * $p < 0.0001$ vs Control a las 48 h. ANOVA una vía, *post-hoc* Bonferroni, $n=3$, dos ensayos independientes por triplicado.

Se midió, además, la expresión génica de algunas citocinas involucradas en la activación del señalosoma de 4-1BB/4-1BBL. El gen de TNF- α aumentó significativamente su expresión 4.5 veces a las 24 h en la concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En el caso de las concentraciones de proteína de 0.1 y 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 h tuvieron un aumento de 1.8 y 2 veces respecto a su control, pero estos no fueron significativos. A las 48h de la estimulación también se puede observar una tendencia al incremento en la expresión génica de TNF- α en todas las concentraciones probadas de la proteína recombinante (Fig. 26).

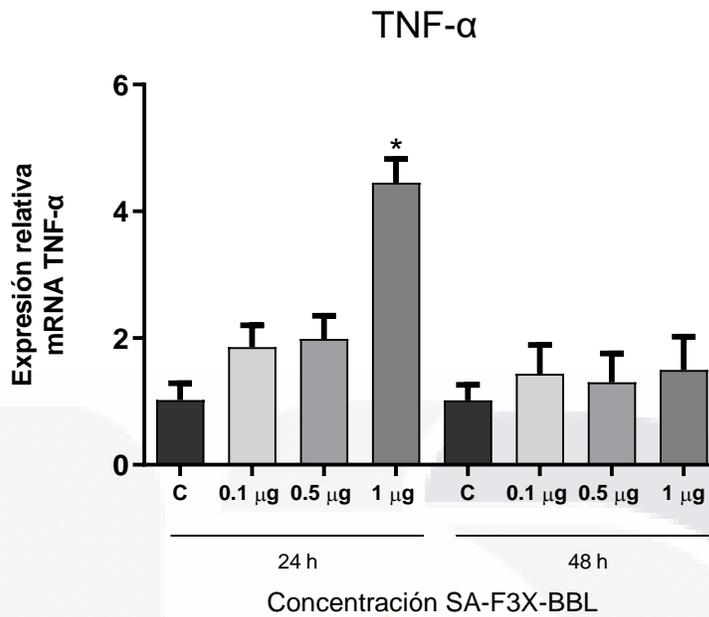


Figura 26. Expresión relativa del gen TNF- α en células RAW 264.7 a diferentes concentraciones de SA-F3X-BBL. * $p < 0.05$ vs Control a las 24 h. ANOVA una vía, *post-hoc* Bonferroni, $n=6$, dos ensayos independientes por triplicado.

De igual forma, la expresión génica de IFN- γ aumentó significativamente 6.9 veces contra el control en las mismas condiciones que TNF- α . Aunque el nivel de mensajero del IFN- γ incrementó en las células RAW 264.7 después de 48 h de la estimulación con la proteína recombinante, estos aumentos no fueron significativos contra su control (Fig. 27).

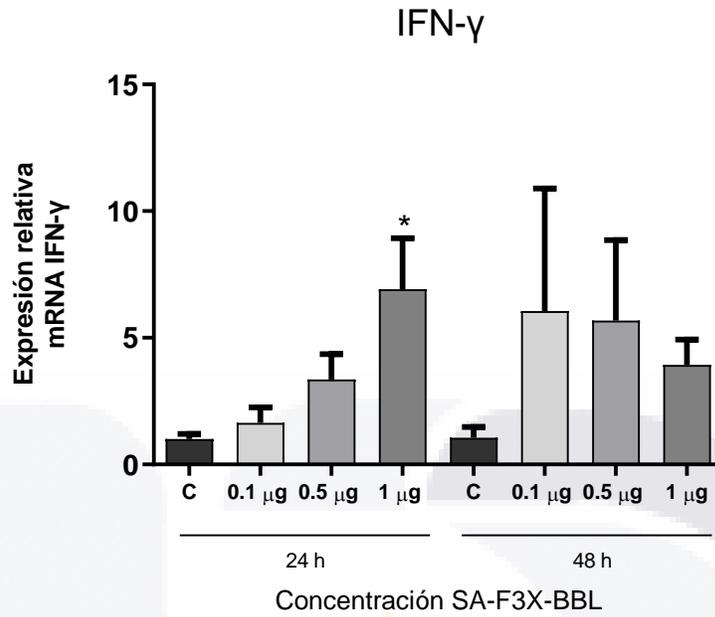


Figura 27. Expresión relativa del gen de IFN- γ en células RAW 264.7 a diferentes concentraciones de SA-F3X-BBL. * $p < 0.05$ vs Control a las 24 h. ANOVA una vía, *post-hoc* Bonferroni, $n=6$, dos ensayos independientes por triplicado.

La expresión del mensajero de IL-12 no cambió significativamente en ninguna de las condiciones realizadas, aunque se puede destacar una tendencia al aumento tras estimular por 48 h las células RAW 264.7 con una concentración de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ de la proteína recombinante (Fig. 28).

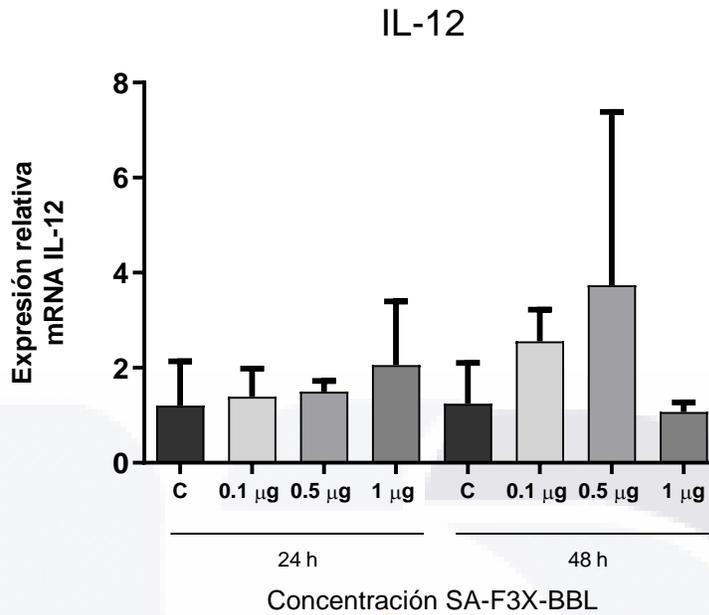


Figura 28. Expresión relativa del gen de IL-12 en células RAW 264.7 a diferentes concentraciones de SA-F3X-BBL. Concentraciones vs respectivo Control ns. ANOVA una vía, *post-hoc* Bonferroni, n=6, dos ensayos independientes por triplicado.

Por último, se evaluaron dos genes involucrados en la inhibición de la apoptosis celular, los cuales también se encuentran involucrados en las vías de señalización analizadas previamente (Tamm y col., 1998; Vaux y col., 1988). El gen BIRC5 presentó aumentos significativos en su expresión a las 24 h en todas las concentraciones analizadas de SA-F3X-BBL. La proteína a 0.1, 0.5 y 1 µg/mL incrementó la expresión del gen de BIRC5 2.9, 3.8 y 4.2 veces respecto a su control. La concentración de 0.1 µg/mL a las 48 h del estímulo aumentó 3.1 veces el nivel de expresión respecto a su control (Fig. 29). A contrario de BIRC5, los niveles del mensajero del gen Bcl2l11 no se modificaron en las células RAW 264.7 en ninguna de las condiciones analizadas en presencia de la proteína recombinante (Fig.30).

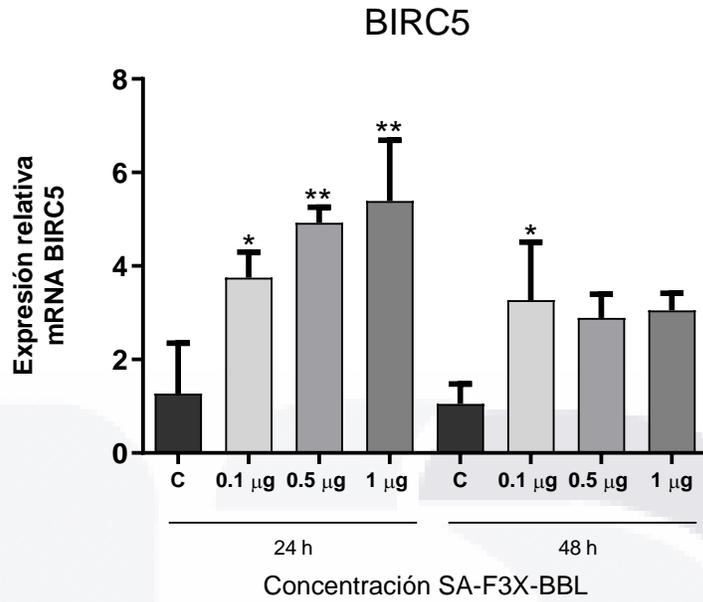


Figura 29. Expresión relativa del gen BIRC5 en células RAW 264.7 a diferentes concentraciones de SA-F3X-BBL. ** $p < 0.0001$; * $p < 0.001$ vs su respectivo Control. ANOVA una vía, *post-hoc* Bonferroni, $n=6$, dos ensayos independientes por triplicado.

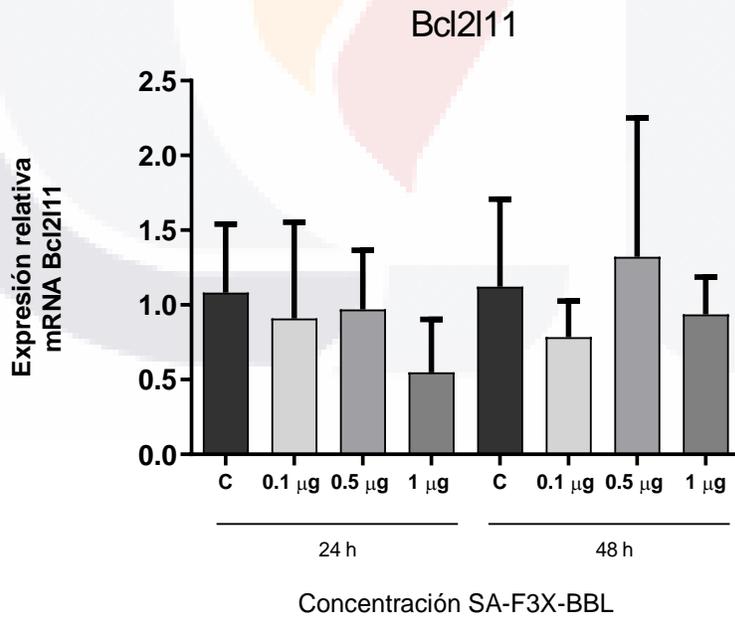


Figura 30. Expresión relativa del gen Bcl2l1 en células RAW 264.7 a diferentes concentraciones de SA-F3X-BBL. Concentraciones vs su respectivo Control ns. ANOVA una vía, *post-hoc* Bonferroni, $n=6$, dos ensayos independientes por triplicado.

CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN



La tecnología de las proteínas recombinantes es uno de los aportes más importantes de la biotecnología moderna, la cual surge de la necesidad del diseño de proteínas terapéuticas, que no se obtengan a partir de fuentes animales y que tengan la capacidad de poseer una o más acciones terapéuticas, abarcando una funcionalidad terapéutica amplia. La manipulación del genoma a través de las herramientas de la ingeniería genética y las plataformas de producción como los sistemas procariontes han permitido la producción en masa de proteínas “personalizadas” dirigidas para el tratamiento de enfermedades metabólicas, inmunoterapia, cáncer y vacunas (Lara, 2011).

La producción de proteínas recombinantes como vacunas permite generar nuevas estrategias para diversos agentes infecciosos como los virus, patógenos frente a los que no se ha logrado generar una vacuna eficaz y segura por los mecanismos de evasión que poseen. El RSV entra en esta categoría de virus que aún no poseen una vacuna aprobada y disponible en el mercado (Boyoglu y col., 2019). El RSV es una de las etiologías más importantes de las ITRB que afectan principalmente a niños menores a 5 años (Nair y col., 2010). La enfermedad severa del RSV está asociada a una fuerte respuesta inmune tipo 2, la cual genera consecuencias a largo plazo como periodos de sibilancias, alergia y asma, al promover un ambiente inflamatorio celular con la generación del perfil Th2 (IL-4) y Th17 (IL-8), generando el reclutamiento de neutrófilos y células T CD4+ (Bacharier y col., 2012; Lotz y Peebles, 2012; Lambert y col., 2014; Malinczak y col., 2021). Por lo tanto, el desarrollo de una vacuna es primordial para evitar dificultades respiratorias a largo plazo y disminuir las hospitalizaciones (Stein y col., 2017). Este virus ha generado varios retos para la generación de una vacuna, ya que cuenta con diferentes mecanismos de evasión del sistema inmune que le ha permitido escapar de las estrategias de las vacunas convencionales. Entre estos retos está el uso de regiones inmunodominantes para evitar los diferentes mecanismos de evasión inmunológica que posee el RSV (Lo y col., 2005; Hashimoto y col., 2009; Swedan y col., 2009) y regiones conservadas, para contrarrestar su variabilidad genética (12 genotipos de RSV-A y 21 de RSV-B) (Cui y col., 2013). Otro reto a considerar, es el de proteger contra reinfecciones, generando memoria a largo plazo y anticuerpos neutralizantes; además de evitar la respuesta Th2 la cual está asociada a la severidad de la enfermedad (Hall y col., 1991; Caballero y col., 2015). Por último, se debe definir a qué población va dirigida la vacuna. Esta debe ser dirigida a los sectores vulnerables, como los adultos mayores (≥ 65 años), los cuales por la consecuente pérdida de eficiencia del sistema inmune y factores de riesgo como enfermedades crónicas pulmonares y cardíacas pueden presentar la enfermedad severa (Shi y col., 2020) y a niños

menores de 5 años. La infección severa se da mayormente en una edad temprana donde el sistema inmunológico y respiratorio se encuentran inmaduros, por lo que una vacuna a menores de 2 años debe considerarse. Un ejemplo de esta problemática lo fue el caso de la vacuna generada en 1960 con RSV-inactivado con formalina y utilizando aluminio como adyuvante, la cual no generó protección en 31 niños pequeños (>6 meses) y se le atribuyó el aumento de la enfermedad en una infección posterior a la vacuna generando la hospitalización del 80%, y la muerte de dos niños entre los 14 y 16 meses de edad (Fulginiti y col., 1969; Kapikian y col., 1969b; Kim y col., 1969). Otra estrategia es la aplicación de vacunas a mujeres embarazadas, ya que se ha observado que recién nacidos menores de 3 semanas, con una alta cantidad de anticuerpos maternos presentar infección moderada y no suelen ser hospitalizados a comparación de niños con pocos anticuerpos o indetectables (Glezen y col., 1981).

Hasta el día de hoy, existen diferentes plataformas para vacunas contra el RSV en estudios clínicos. RSV MEDI DM2-2 es una vacuna de virus atenuada a la cual se le eliminó el marco de lectura abierta del RNA de la proteína M2-2. Se aplicó a 50 adultos, 10 niños RSV-seropositivos entre 1 a 59 meses y 20 RSV-seronegativos entre 6 y 24 meses. Encontraron aumento de anticuerpos neutralizantes en el 95% de los vacunados y anticuerpos anti-F en el 90% (Karron y col., 2015). Abarca y col. en 2020, publicaron la fase 1 de su vacuna rBCG-N-hRSV, formada por bacteria recombinante *Mycobacterium bovis* expresando la proteína N del RSV. Se administró en hombres entre 18 a 50 años y reportó el incremento de IgG con capacidad de neutralizar el RSV *in vitro*. En la plataforma de proteínas recombinantes, está Pre-F-GCN4t, la cual es una modificación de la proteína F en la conformación de pre-F. Se evaluó en fase 1 en hombres entre 18 y 44 años, donde observaron anticuerpos neutralizantes contra RSV-A hasta el día 60 (Langley y col., 2017). MEDI7510 es una vacuna proteica de la proteína F en post-F. La fase I del estudio clínico se realizó en adultos >60 años, generando el 50% de ellos microneutralización. Todos sus sujetos de estudio presentaron IgG anti-F (Falloon y col., 2016). Esta misma se evaluó en una segunda fase con 2000 adultos mayores, pero no mostró eficacia (Falloon y col., 2017). En el 2019, Leroux-Roles y col. realizaron un estudio con la misma vacuna con hombres y mujeres de 18 a 45 años, donde la respuesta inmune se mantuvo por 6 meses, pero no hubo un efecto de refuerzo en la segunda dosis. Otras como la MVA-BN-RSV (Samy y col., 2020), ChAd155-RSV (Cicconi y col., 2019) y la nanopartícula con RNA mensajero RSV-F (Aliprantis y col., 2020) se encuentran actualmente en fase 1 o 2, y no han presentado efectos adversos más allá de la cefalea y artralgia. Sin embargo, requieren de más estudios

en diferentes grupos de personas como en mujeres embarazadas y varias de ellas no llegan a presentar una respuesta inmune robusta y prolongada (Shan y col., 2021).

En este trabajo se propuso la producción de una proteína recombinante con 3 elementos: *i)* El core de la estreptavidina (SA), la cual permite la oligomerización entre estas proteínas para una mayor transducción de señales, *ii)* la proteína F del RSV con un tándem de 3 repeticiones del sitio II inmunodominante de la proteína, *iii)* y una proteína de co-estimulación del sistema inmune de la familia de los TNFR/L (4-1BBL). Se logró la producción de la proteína recombinante a partir del vector de expresión pET6xHN-SA-F3X-4-1BBL en un sistema procarionte (*E. coli* C43). La cepa C43 es una cepa derivada de *E. coli* BL21 (D37). Estas cepas expresan a la polimerasa de ARN T7, cuyo gen fue insertado a partir del profago lisogénico DE3, y su expresión está bajo el control inducible por IPTG con el promotor *lac* UV5, el cual posee 2 mutaciones en la región -10 del gen de *lac1*, el cual reporta mayores rendimientos (Studier y col., 1990). Además, C43 tiene la ventaja de poder producir una gran cantidad de proteína sin generar efectos tóxicos en la bacteria (Miroux y Walker, 1996).

La proteína recombinante SA-F3X-BBL purificada se obtuvo con una concentración de IPTG 1mM por 24h, obteniendo un rendimiento total de 5.6%. y un peso molecular de 84.4 kDa. Se esperaba obtener un rendimiento de la proteína recombinante mayor a la obtenida, pero comparándola con modelos donde se utiliza C43, se obtienen cantidades similares. Tian y col. (2009) obtuvieron 0.0113 µg/µL, pero justifican la pérdida de proteína en la poca especificidad de la resina de la columna de purificación de níquel. En este proyecto se utilizó un kit de purificación de columnas de níquel (kit His-Spin Protein Miniprep de Zymo), ya que el constructo de nuestra proteína recombinante está conformada al principio por una etiqueta de 6 histidinas (Fig. 12), las cuales son utilizadas para que se unan al níquel de la columna en el proceso de purificación (Hefti y col., 2001). Zhao y col. (2018) compararon la extracción de extracto crudo, obteniendo rendimientos totales desde el 56% al 8.23% en diferentes proteínas recombinantes con columnas de níquel, pero diferentes concentraciones de IPTG. Otro factor es la temperatura incorrecta de la inducción, que puede generar la formación de cuerpos de inclusión que no permitan ver a la proteína en la fracción soluble (Mitraki y col., 1991). Otros factores que se atribuyen a la formación de cuerpos de inclusión son el pH, osmolaridad, potencial redox y cofactores (Rosano y Ceccarelli, 2014). Masi y col. (2003) lograron sobreexpresar 3 proteínas recombinantes con un rendimiento del 20% utilizando C43 e induciéndolo con 1mM de IPTG utilizando la misma

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

técnica de la cola de histidinas. La pureza de la proteína recombinante después de la purificación, puede observarse directamente en el gel de SDS-PAGE con azul de coomassie, donde solo se observa una banda a 84.4 kDa (Fig. 16).

Para poder evaluar el efecto biológico de la proteína recombinante obtenida, se utilizó un modelo de estudio *in vitro* en el que CPA (RAW 264.7) fueron expuestas a diferentes concentraciones de la proteína, para definir aquellas concentraciones no tóxicas en las cuales se pueda evaluar su efecto biológico. Li y col. (2018) utilizaron diferentes concentraciones de su proteína rhBNP para observar la toxicidad en células RAW 264.7, y determinar la mejor concentración para sus estudios posteriores a las 24 y 48h del estímulo, en las cuales utilizaron concentraciones que mantuvieran la viabilidad celular a más del 80%, considerándolo una toxicidad débil. En nuestro modelo, las células RAW 264.7 presentaron una muerte celular del 37% en la concentración de 2 µg/mL a las 24 h, mientras que a concentración de 3 µg/mL llegaron a tener una caída del 30% de supervivencia celular a las 24 h y a las 48 h, por lo que se utilizaron las concentraciones de 0.1, 0.5 y 1 µg/mL para los ensayos de estimulación antigénica *in vitro*, donde se mantuvo la viabilidad celular mayor al 90%. Se utilizaron condiciones similares a lo ya reportado en modelos de toxicidad con células RAW 264.7, pero la caída observada a las 24 h y 48 h de las concentraciones de 3 y 2 µg/mL tan marcadas no se observan en estos modelos con el uso de concentraciones más altas de proteína recombinante. Además de que la naturaleza de cada proteína es diferente, un punto a considerar es las endotoxinas bacterianas que pudieron pasar por la columna de níquel durante la purificación, al no realizar un segundo paso para asegurarnos de sólo obtener la proteína recombinante, y al aumentar la concentración de esta, se esté incrementando la concentración de estas endotoxinas (García y col., 2013).

Como ya se mencionó antes, la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 fue el modelo *in vitro* de este proyecto, ya que al ser una CPA participa en el procesamiento de los antígenos (Liechtenstein y col. 2012), como el inmunógeno F3X de la proteína de fusión del RSV, que forma parte de nuestra proteína recombinante. Además, la subunidad proteica que se evaluó en este trabajo contiene 4-1BBL, el cual funge como adyuvante de la proteína SA-F3X-BBL. La proteína 4-1BBL, es uno de los co-estimuladores que participa en la segunda señal, que promueven la activación de células T, expansión clonal y su diferenciación a células efectoras (Pollizzi y Powell, 2014; Jakubzick y cols 2017). La molécula co-estimuladora 4-1BB pertenece a la superfamilia de TNFR y puede interactuar con el ligando 4-1BBL para desempeñar un papel en las respuestas inmunitarias innatas y

adaptativas (Dharmadhikari y col., 2015). En modelos *in vivo* pre-clínicos para cáncer, ya se ha demostrado que la proteína SA-4-1BBL puede generar una respuesta robusta específica al antígeno de tipo Th1, generando la expansión de células T CD4+ y CD8+, Treg CD4+CD25+Foxp3+ y la expresión de IFN- γ , IL-2 contra el antígeno E7 del VPH, evitando la progresión de tumores (Sharma y col., 2009; Sharma y col., 2010a; Sharma y col., 2010b), sin la generación de toxicidad celular en comparación a los anticuerpos anti-4-1BBL (Schabowsky y col., 2009).

Tanto 4-1BBL como 4-1BB se expresan en macrófagos (Jung y col., 2014; Miki y col., 2020). La proteína recombinante logró estimular la expresión génica de 4-1BB a las 24 y 48 h del estímulo en las células RAW 264.7 a una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo cual también se vió reflejado en la expresión proteica, que se observó aumentada a las 48h. Además, se observó la estimulación del gen de 4-1BBL en las misma concentración a las 48h. Estos resultados muestran que la proteína recombinante es biológicamente activa, regulando al alza tanto la expresión de 4-1BB como de 4-1BBL en los macrófagos. Por lo tanto, por un lado, el macrófago está capacitado para activar adecuadamente a las células T durante la respuesta inmune a la proteína recombinante ya que expresa mas 4-1BBL; y por otro lado, va a poder responder más intensamente a la propia proteína recombinante al sobreexpresan 4-1BB. En este sentido, después de la unión con su ligando, 4-1BB se asocia con las proteínas TRAF2 en su cola citoplasmática, regulando la señalización río abajo del señalosoma 4-1BB/4-1BBL (Yang y col., 2008). TRAF2 es una proteína que funciona como anclaje para la ubiquitinación de proteínas de diferentes de vías de señalización como NF- κB (Sanchez y col., 2016). TRAF2 es capaz de sobreexpresarse ante algún estímulo generado por un receptor al que pueda asociarse. En macrófagos peritoneales, TRAF2 aumentó su expresión proteica en presencia de la sobreexpresión de RIG-1 y el estímulo con LPS e IFN- γ (Zhou y col., 2020). En el caso del estímulo con SA-F3X-BBL, TRAF2 tuvo su expresión proteica más alta con 0.5 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la proteína a las 24 h, aunque también se observó una tendencia al aumento en la expresión de TRAF2 las 48h. Las proteínas TRAF, además de ser reclutadas por 4-1BBL, también participan en la señalización por la estimulación de otros receptores celulares, como los TLRs (Sujitha y col., 2018). Por lo que, un aumento de TRAF2 también pudiera estar mediado por la respuesta celular generada por el antígeno F3X, presente en la proteína recombinante, vía TLR-4; ya que se ha mostrado que la glicoproteína F puede ser reconocida vía CD14/TLR4 (Kurt-Jones y col., 2000), ambos presentes en las células RAW 264.7 (Gambelli y col., 2003; Xiang y col. 2015;).

Después del reclutamiento de TRAF2 por la unión de 4-1BB a su ligando, se unen la ubiquitina K63, lo que conduce a la fosforilación mediada por TAK1 (Fan y col., 2010), la cual fosforila a las subunidades de IKK (IKK α e IKK β) (Chen, 2012), lo que posteriormente da como resultado la fosforilación y degradación proteasomal de I κ B α , que da como resultado la translocación al núcleo de las proteínas de NF- κ B (Mei y col., 2016). Por lo tanto, en la vía canónica de NF- κ B se fosforila I κ B por la activación del complejo IKK rio arriba, fosforilando y llevándolo a degradación, dejando al complejo de NF- κ B para translocarse al núcleo (Madonna y col. 2012). Además, TAK1 participa en la activación de p38 α/β de la ruta de las MAPK (Cannons, 2000). La cinasa p38 de MAPK está codificada en cuatro genes diferentes. La cinasa p38 α (MAPK14), p38 β , p38 γ y p38 δ , las cuales participan en diferentes procesos biológicos en respuesta a estímulos extracelulares que resultan en la inflamación, proliferación celular, apoptosis, diferenciación y tumorigénesis (Han y col., 1994; Chen y col., 2020; Raugeaud y col., 1995).

Se evaluó por medio de western blot el nivel proteico de I κ B y p38 α/β fosforilado y no fosforilado para comprobar la activación de las vías de señalización rio abajo. La proteína p38 α/β fue activada (fosforilada) en células RAW 264.7 con la estimulación de la proteína en todas las condiciones que se evaluaron. Cuando se analizó la fosforilación de la subunidad I κ B para comprobar la activación de la vía de señalización NF- κ B, la condición en la que se fosforiló la proteína I κ B fue a las 48h y en respuesta a una concentración de proteína recombinante de 1 μ g/mL. Se ha descrito que p38 se activa en respuesta a un estrés celular por medio del señalosoma 4-1BB/4-1BBL en RAW 264.7 (Tu y col., 2012) y esta ruta es importante para la producción de citocinas como TNF- α e IL-6 en la presencia de un agonista de 4-1BB en macrófagos murinos (Kim y col., 2011). Al activarse esta vía por medio del señalosoma 4-1BB/4-1BBL puede generar la respuesta de citocinas tanto del perfil Th1 como del perfil Th2 (Cannons y col., 2000). Li y col. (2019a) generaron la proteína rNc14-3-3 como vacuna contra *Neospora caninum*, la cual generó la activación de las vías p38 MAPK y NF- κ B, produciendo citocinas como IL-6, IL-12p40 y TNF- α en macrófagos murinos peritoneales. Han y col. (2018) utilizaron proteínas recombinantes inmunogénicas del VPH para estimular CDs in vitro, al estimular p38 MAPK y NF- κ B, produciendo citocinas como IL-6 e IFN- α . Liu y col. (2016) generaron la proteína rH-NS contra *Mycobacterium tuberculosis* para generar una respuesta Th1. En RAW 264.7 observaron la activación de la vía NF- κ B y la producción de IL-6, IL-12 y TNF- α en los sobrenadantes del cultivo celular. En respuesta a nuestra proteína SA-F3X-BBL, la activación de estas vías generó la producción de TNF a las 24h con una concentración de 0.5 μ g/mL y de IFN- γ el cual se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

elevó su expresión génica a las 24h (1 $\mu\text{g/mL}$) y se mantuvo a las 48h (0.1 y 0.5 $\mu\text{g/mL}$). Al comparar las condiciones en las que se incrementaron estas citocinas y la presencia de la activación de las vías, p38 α/β parece ser la responsable de la producción de TNF e IFN- γ . La expresión de la citocina pro-inflamatoria TNF- α en RAW 264.7 es dependiente de la estimulación de 4-1BBL por medio de la vía MAPK (Ma y col., 2013), la cual se ve reflejada en la estimulación de la proteína recombinante de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ a las 24h. La producción de IFN- γ es importante por la función de la citocina en el aumento de expresión del MHC de clase I, estimulando el procesamiento y presentación del antígeno (Zhou, 2009) y también participa en la generación de linfocitos T CD4+ contra el RSV (Bukreyev y col., 2001). En los resultados arrojados se observó que los macrófagos de la línea celular RAW 264.7 tuvieron la capacidad de producir estas citocinas gracias a la estimulación de la proteína recombinante, excepto por la IL-12, la cual se evaluó con las mismas condiciones de estimulación, pero no presentó diferencias significativas contra sus respectivos controles. La IL-12 es una citocina que se expresa en macrófagos durante las respuestas inmunes innatas y adaptativas. Esta citocina estimula la proliferación de células NK (Freeman y col., 2015), diferenciación de T CD4+ (Sin y col., 1999) y activación de T CD8+ (Thomas y col., 2016). La producción de esta citocina en células RAW 264.7 está dada por la presencia del IFN- γ , pero utilizado como intermediario a la ruta NF- κB (Kollet y Petro, 2006.) y por la estimulación de IFN- γ a través de la vía p38 MAPK en células T activadas (Zhang y Kaplan, 2000), por lo que se especula que el aumento no significativo de IL-12 a las 48h a 0.5 $\mu\text{g/mL}$ está ligado con el incremento de IFN- γ en las mismas condiciones, pero NF- κB no estaba activada en esa misma condición.

Otro de los factores importantes en el efecto biológico de la proteína SA-F3X-BBL es la supervivencia celular, para poder generar una activación celular prolongada y memoria a largo plazo. BIRC5 (inhibidor baculoviral de la repetición de apoptosis que contiene 5) es miembro de la familia de inhibidores de la apoptosis (IAP) (Garg y col., 2016). BIRC5 actúa como un supresor de la apoptosis en citoplasma y núcleo, al inhibir la activación de caspasas 9 para evitar o retardar la apoptosis celular (Altieri, 2006), y puede influenciar en la división celular dependiendo de la variante del gen expresado (Li y col., 2005). La proteína recombinante logró generar la respuesta de supervivencia celular dependiente de la señalización con 4-1BB/4-1BBL a las 24 h de la estimulación con una concentración de 0.5 $\mu\text{g/mL}$. Esto también se vio reflejado en la prueba de supervivencia y proliferación celular (MTT) al observar porcentajes mayores al 100% (control) con las concentraciones de 0.1 y 0.5 $\mu\text{g/mL}$ sólo en las 24 h de la estimulación, lo que coincide con las condiciones de

expresión de BIRC5, pero estas diferencias no fueron significativas en la prueba de MTT. El incremento de la expresión del gen BIRC5 ha sido estudiado solamente en células T en función de la co-estimulación de 4-1BB en un modelo de melanoma humano, observando la expansión de linfocitos T CD8+ (Chacon y col., 2013) y su expresión depende de la activación de la vía de señalización NF- κ B (Li y col., 2019b). En este trabajo BIRC5 se expresó con 0.1 a 1 μ g/mL de proteína recombinante a las 24h, a comparación de NF- κ B que se observó en una condición diferente, sugiriendo que son dos eventos no relacionados. Bcl2l11 es otro gen involucrado en supervivencia celular pues participa en la vía intrínseca de la apoptosis celular. Bcl-2 está asociada a la proteína Bax, la cual forma complejos de poros en la membrana mitocondrial, lo que genera la liberación de moléculas activadoras de caspasas, como el citocromo C, provocando apoptosis celular (Cory y Adams, 2002). La expresión de Bcl-2 también está condicionada por la activación de NF- κ B en macrófagos (RAW 264.7), pero no hay antecedentes de su activación por medio de la activación del señalosoma 4-1BB/4-1BBL, pero si en linfocitos T (Lee y col., 2002). En el caso del modelo con RAW 264.7 el gen de Bcl-2 no presentó cambios significativos con la estimulación con la proteína recombinante a las 24 y 48 h, sugiriendo que no está participando en la supervivencia de las células estimuladas con SA-F3X-BBL.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSIONES



Se produjo una proteína recombinante a partir del vector pET-6xHN 6X-SA-F3X-4-1BBL en un sistema procarionte. La proteína se purificó, identificó y evaluó su efecto biológico en un modelo *in vitro* en macrófagos murinos RAW264.7 analizando activación de proteínas de vías de señalización y expresión genética de citocinas, arrojando los resultados las siguientes conclusiones:

- La proteína recombinante SA-F3X-BBL puede obtenerse en la fracción soluble de células *E. coli* transformadas con el vector pET-6xHN 6X-SA-F3X-4-1BBL, con un tamaño de aproximadamente 84.4 kDa.
- La proteína recombinante SA-F3X-BBL no muestra toxicidad en los macrófagos RAW 264.7 a concentraciones de 0.1, 0.5 y 1 µg/mL.
- La proteína recombinante SA-F3X-BBL activó los macrófagos RAW 264.7, induciendo la sobreexpresión del receptor 4-1BB y de 4-1BBL generando así el señalosoma 4-1BB/4-1BBL.
- En macrófagos activados por la proteína SA-F3X-BBL se incrementó TRAF2, lo que se asoció con la activación de p38 MAPK a las 24 y 48 h y de NF-κB a las 48 h.
- La proteína recombinante SA-F3X-BBL aumentó la expresión génica de las citocinas IFN-γ y TNF-α por los macrófagos RAW 264.7, así como de la proteína antiapoptótica BIRC5. Desde el punto de vista temporal coincide con la activación de p38 MAPK.

CAPÍTULO IX

BIBLIOGRAFÍA



- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Abarca, K., Rey-Jurado, E., Muñoz-Durango, N., Vázquez, Y., Soto, J., Gálvez, N., Valdés-Ferrada, J., Iturriaga, C., Urzúa, M., Borzutzky, A., Cerda, J., Villarroel, L., Madrid, V., González, P., González-Aramundiz, J., Bueno, S., Kalergis, A. 2020. Safety and immunogenicity evaluation of recombinant BCG vaccine against respiratory syncytial virus in a randomized, double-blind, placebo-controlled phase I clinical trial. *EClinicalMedicine*, 27, 100517.
 - Agelaki, S., Tsatsanis, C., Gravanis, A., Margioris, A. 2002. Corticotropin-releasing hormone augments proinflammatory cytokine production from macrophages in vitro and in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock in mice. *Infect Immun.* 70, 6068–74.
 - Aggarwal, B. 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature reviews. Immunology.* 3(9), 745–756.
 - Akahane, K., Someya, K., Tsutomi, Y., Akimoto, T., Tohgo, A. 1994. Antitumor synthetic lipid A analog DT-5461a upregulates cytokine expression in a murine macrophage cell line through LPS pathway. *Cell Immunol.* 155, 42–52.
 - Alexopoulou, L., Holt, A., Medzhitov, R., Flavell, R. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature.* 413: 732-738.
 - Aliprantis, O., Shaw, C., Griffin, P., Farinola, N., Panther, L. 2021. A phase 1, randomized, placebo-controlled study to evaluate the safety and immunogenicity of an mRNA-based RSV prefusion F protein vaccine in healthy younger and older adults, *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 17:5, 1248-1261.
 - Altieri, D. 2006. The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. *Current opinion in cell biology*, 18(6), 609–615.
 - Alvarez, S., Harikumar, K., Hait, N., Allegood, J., Strub, G., Kim, E., Maceyka, M., Jiang, H., Luo, C., Kordula, T., Milstien, S., Spiegel, S. 2010. Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature.* 465(7301), 1084–1088.
 - American Academy of Pediatrics. Respiratory syncytial virus. In: Red Book: 2012 Report of the Committee on Infectious Diseases, 29th, Pickering LK, *American Academy of Pediatrics*, Elk Grove Village, IL 2012. p.609.
 - Anderson, L., Hendry, R., Pierik, L., Tsou, C., McIntosh, K. 1991. Multicenter study of strains of respiratory syncytial virus. *J Infect Dis.*; 163, 687–92.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Anderson, L., Hierholzer, J., Tsou, C., Hendry, R., Fernie, B., Stone, Y., McIntosh, K. 1985. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J Infect Dis.* 151, 626-33.
 - Arch, R. y Thompson, C. 1998. 4-1BB and Ox40 are members of a tumor necrosis factor (TNF)-nerve growth factor receptor subfamily that bind TNF receptor-associated factors and activate nuclear factor kappaB. *Mol Cell Biol.* 18(1):558-65.
 - Argaraña, C. E., Kuntz, I. D., Birken, S., Axel, R., & Cantor, C. R. 1986. Molecular cloning and nucleotide sequence of the streptavidin gene. *Nucleic acids research.* 14(4), 1871–1882.
 - Armant, M., y Fenton, M. 2002. Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome Biol.* 3, 3011.
 - Arnold, C., Whyte C., Gordon, P., Barker, R., Rees, A., Wilson, H. 2014. A critical role for suppressor of cytokine signalling 3 in promoting M1 macrophage activation and function in vitro and in vivo. *Immunology.* 141, 96–110.
 - Atreya, P., Peeples, M., Collins, P. 1998. The NS1 protein of human respiratory syncytial virus is a potent inhibitor of minigenome transcription and RNA replication. *J Virol.* 72:2, 1452-61
 - Ávila, L. y Castellanos, J. 2013. Diagnóstico virológico De la infección por virus sincitial respiratorio. *Rev. Sal. Bos.* 3;1, 23-36.
 - Bacharier, L., Cohen, R., Schweiger, T., Yin-Declue, H., Christie, C., Zheng, J., Schechtman, K., Strunk, R., Castro, M. 2012. Determinants of asthma after severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 130(1), 91–100.e3.
 - Banchereau, J. y Palucka, A. 2005. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol.* 5, 296-306.
 - Banchereau, J. y Steinman, R. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392, 245–52.
 - Baneyx, F. 1999. Recombinant protein expression in Escherichia coli. *Current Opinion in Biotechnology.* 10, 411-421.
 - Barclay, W., al-Nakib, W., Higgins, PG., Tyrrell, D. 1989. The time course of the humoral immune response to rhinovirus infection. *Epidemiol. Infect.* 103(3):659–69.
 - Barros, M., Hauck, F., Dreyer, J., Kempkes, B., Niedobitek, G. 2013. Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PLoS One.* 8, 80908.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Bayer, E. A., Ben-Hur, H., Hiller, Y., & Wilchek, M. 1989. Postsecretory modifications of streptavidin. *The Biochemical journal*. 259(2), 369–376.
 - Bayer, E., Ben-Hur, H., Gitlin, G., Wilchek, M. 1986. An improved method for the single-step purification of streptavidin. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 13(2), 103–112.
 - Beetz, S., Wesch, D., Marischen, L., Welte, S., Oberg, H., Kabelitz, D. 2008. Innate immune functions of human gammadelta T cells. *Immunobiology*. 213, 173-82.
 - Beham, A., Puellmann, K., Laird, R., Fuchs, T., Streich, R., Breysach, C. 2011. A TNF-regulated recombinatorial macrophage immune receptor implicated in granuloma formation in tuberculosis. *PLoS Pathog*. 7, 1002375.
 - Bendelja, K., Vojvoda, V., Aberle, N., Cepin-Bogovic, J., Gagro, A., MlinaricGalinovic, G., Rabatic, S. 2010. Decreased Toll-like receptor 8 expression and lower TNF-alpha synthesis in infants with acute RSV infection. *Respir Res* 11, 143.
 - Bermingham, A., y Collins, P. 1999. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*. 28; 96:20, 11259-64.
 - Beutler, B. 2004. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol*. 40: 845-859.
 - Billiau, A. y Matthys, P. 2009. Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev*. 20, 97–113.
 - Bitko, V., Shulyayeva, O., Mazumder, B., Musiyenko, A., Ramaswamy, M., Look, D., Barik, S. 2007. Nonstructural Proteins of Respiratory Syncytial Virus Suppress Premature Apoptosis by an NF-κB-Dependent, Interferon-Independent Mechanism and Facilitate Virus Growth. *J Virol*. 81:4, 1786–1795.
 - Blondot, M., Dubosclard, V., Fix, J., Lassoued, S., Aumont-Nicaise, M., Bontems, f., Eléouët, J., Sizun, C. 2012. Structure and Functional Analysis of the RNA- and Viral Phosphoprotein-Binding Domain of Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein. *PLoS Pathog*. 8:5, e10027.
 - Bluestone, J. 2011. Mechanisms of tolerance. *Immunol Rev*. 241, 5-19.
 - Boukamp, P., Dzarlieva-Petrusevska, R., Breitkreuz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N. 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol*. 106: 761-771.
 - Boyoglu-Barnum S, Chirkova T, Anderson L. 2019. Biology of Infection and Disease Pathogenesis to Guide RSV Vaccine Development. *Front Immunol*. 10:1675.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Bramley, A., Vitalis, T., Wiggs, B. 1999. Effects of respiratory syncytial virus persistence on airway responsiveness and inflammation in guinea-pigs. *Eur. Respir. J.* 14, 1061–1067.
 - Bremer, E. 2013. Targeting of the tumor necrosis factor receptor superfamily for cancer immunotherapy. *ISRN oncology*, 2013, 371854.
 - Briend, E., Colle, J., Fontan, E., Saklani-Jusforgues, H., Fauve, R. 1995. Human glycoprotein HGP92 induces cytokine synthesis in mouse mononuclear phagocytes. *Int Immunol.* 7, 1753–61.
 - Brower, M. S., Brakel, C. L., & Garry, K. 1985. Immunodetection with streptavidin-acid phosphatase complex on Western blots. *Analytical biochemistry.* 147(2), 382–386.
 - Bukreyev, A., Belyakov, I., Berzofsky, J., Murphy, B, Collins, P. 2001. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expressed by recombinant respiratory syncytial virus attenuates viral replication and increases the level of pulmonary antigen-presenting cells. *J of virol*, 75(24), 12128–12140.
 - Caballero, M., Serra, M., Acosta, P., Marzec, J., Gibbons, L., Salim, M., Rodriguez, A., Reynaldi, A., Garcia, A., Bado, D., Buchholz, U. J., Hijano, D., Coviello, S., Newcomb, D., Bellabarba, M., Ferolla, F. M., Libster, R., Berenstein, A., Siniawski, S., Blumetti, V., Polack, F. 2015. TLR4 genotype and environmental LPS mediate RSV bronchiolitis through Th2 polarization. *The Journal of clinical investigation*, 125(2), 571–582.
 - Calder, L., González, L., García, B., Wharton, S., Skehel, J., Wiley, D., Melerot, J. 2000. Electron Microscopy of the Human Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein and Complexes That It Forms with Monoclonal Antibodies. *Viol.* 271, 122-131.
 - Campos, M., Almeida, I., Takeuchi, O., Akira, S., Valente, E., Procopio, D., Travassos, L., Smith, J., Golenbock, D., Gazzinelli, R. 2001. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J. Immunol.* 167, 416-423.
 - Cane, P., Matthews, D., Pringle, C. 1991. Identification of variable domains of the attachment (G) protein of subgroup A respiratory syncytial viruses. *J Gen. Virol.* 72, 2091-6.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Cannons, J., Choi, Y., Watts, T. 2000. Role of TNF receptor-associated factor 2 and p38 mitogen-activated protein kinase activation during 4-1BB-dependent immune response. *J Immunol.* 165(11), 6193–6204.
 - Cannons, J., Lau, P., Ghumman, B., DeBenedette, M., Yagita, H., Okumura, K. 2001. 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. *J Immunol.* 167:1313–24.
 - Cartee, T. y Wertz, G. 2001. Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein Requires Phosphorylation for Efficient Function and Binds Viral RNA during Infection. *J Virol.* 75:24, 12188–12197.
 - Cartee, T., Megaw, A., Oomens, A., Wertz, G. 2003. Identification of a Single Amino Acid Change in the Human Respiratory Syncytial Virus L Protein That Affects Transcriptional Termination. *J Virol.* 77:13, 7352–7360.
 - Cartun, R., y Pedersen, C. 1989. An Immunocytochemical Technique Offering Increased Sensitivity and Lowered Cost with a Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate. *J Histotechnology.* 12, 4.
 - Castagne, N., Barbier, A., Bernard, J., Rezaei, H., Huet, J., Henry, C., Da Costa, B., Eléouet, J. 2004. Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus P–P and P–N protein complexes and localization of the P protein oligomerization domain. *J Gen. Virol.* 85, 1643–1653.
 - Cavanagh, M., Gwyer, E. British Society for Immunology.
 - Chacon, J., Wu, R., Sukhumalchandra, P., Mollrem, J., Sarnaik, A., Pilon-Thomas, S., Weber, J., Hwu, P., Radvanyi, L. 2013. Co-stimulation through 4-1BB/CD137 improves the expansion and function of CD8(+) melanoma tumor-infiltrating lymphocytes for adoptive T-cell therapy. *PloS one*, 8(4), e60031.
 - Chakarov, S. y Fazilleau, N. 2014. Monocyte-derived dendritic cells promote T follicular helper cell differentiation. *EMBO Mol. Med.* 6, 590–603.
 - Chambers, P., Pringle, C., Easton, A. 1992. Sequence analysis of the gene encoding the fusion glycoprotein of pneumonia virus of mice suggests possible conserved secondary structure elements in paramyxovirus fusion glycoproteins. *J Gen. Virol.* 73, 1717-1724.
 - Chamma, I., Levet, F., Sibarita, J.-B., Sainlos, M., Thoumine, O. 2016. Nanoscale organization of synaptic adhesion proteins revealed by single-molecule localization microscopy. *Neurophotonics*, 3(4), 041810.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Chávez, L., Olleros, M., Vesin, D., Garcia, I. 2015. Much More than M1 and M2 Macrophages, there are also CD169+ and TCR+ Macrophages. *Front Immunol.* 6, 263.
 - Chen, J. y Chen, Z. 2013. Regulation of NF- κ B by ubiquitination. *Curr Opin Immunol.* 25(1):4-12.
 - Chen, X., Hao, A., Li, X., Ye, K., Zhao, C., Yang, H., Ma, H., Hu, L., Zhao, Z., Hu, L., Ye, F., Sun, Q., Zhang, H., Wang, H., Yao, X., Fang, Z. 2020. Activation of JNK and p38 MAPK Mediated by ZDHHC17 Drives Glioblastoma Multiforme Development and Malignant Progression. *Theranostics*, 10(3), 998–1015.
 - Chen, Z. 2012. Ubiquitination in signaling to and activation of IKK. *Immunological reviews*, 246(1), 95–106.
 - Cheng, X., Park, H., Zhou, H., Jin, H. 2005. Overexpression of the M2-2 Protein of Respiratory Syncytial Virus Inhibits Viral Replication. *J Virol.* 79:22, 13943–13952.
 - Chiba, Y., Higashidate, Y., Suga, K. 1989. Development of cell-mediated cytotoxic immunity to respiratory syncytial virus in human infants following naturally acquired infection. *J. Med. Virol.* 28, 133–139.
 - Chin, J., Magoffin, R., Shearer, L. 1969. Field evaluation of a respiratory syncytial virus vaccine and a trivalent parainfluenza virus vaccine in a pediatric population. *Am. J. Epidemiol.* 89, 449–463.
 - Chirkova, T., Lin, S., Oomens, A. 2015. CX3CR1 is an important surface molecule for respiratory syncytial virus infection in human airway epithelial cells. *J Gen. Virol.* 96, 2543–2556.
 - Chuang, T. y Ulevitch, R. 2000. Cloning and characterization of a sub-family of human tolllike receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur. Cytok. Netw.* 11: 372-378.
 - Cicconi, P., Jones, C., Sarkar, E., Silva-Reyes, L., Klenerman, P., de Lara, C., Hutchings, C., Moris, P., Janssens, M., Fissette, L. A., Picciolato, M., Leach, A., Gonzalez-Lopez, A., Dieussaert, I., Snape, M. 2020. First-in-Human Randomized Study to Assess the Safety and Immunogenicity of an Investigational Respiratory Syncytial Virus (RSV) Vaccine Based on Chimpanzee-Adenovirus-155 Viral Vector-Expressing RSV Fusion, Nucleocapsid, and Antitermination Viral Proteins in Healthy Adults. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 70(10), 2073–2081.
 - Collado, V., Porras, R., Cutuli, T., Gómez, E. 2008. The innate immune system i: its mechanisms. *Rev. Compl C Vet.* 2:1, 1-16.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Collin, M., McGovern, N., Haniffa, M. 2013. Human dendritic cell subsets. *Immunology* 140(1):22–30.
 - Collins, P. y Mottet, G. 1991. Post-translational processing and oligomerization of the fusión glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J Gen. Virol.* 72, 3095-3101.
 - Collins, P., Dickenst, L., Buckler, A., Olmsted, R., Spriggs, M., Camargo, E., Coelingh, K. 1986. Nucleotide sequences for the gene junctions of human respiratory syncytial virus reveal distinctive features of intergenic structure and gene order. *Proc. Nati Acad Sci. USA.* 83, 4594-4598.
 - Collins, P., Fearn, R., Graham, G. 2013. Respiratory Syncytial Virus: Virology, Reverse Genetics, and Pathogenesis of Disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 372: 3–38.
 - Collins, P., Olmsted, R., Spriggs, M., Johnson, P., Buckler-White, A. 1987. Gene overlap and site-specific attenuation of transcription of the viral polymerase L gene of human respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci.* 84(15):5134-8.
 - Corti, D., Bianchi, S., Vanzetta F. 2013. Cross-neutralization of four paramyxoviruses by a human monoclonal antibody. *Nature.* 19; 501, 439–443.
 - Cory, S., y Adams, J. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature reviews. Cancer,* 2(9), 647–656.
 - Corzo, M. y Valdés, O. 2013. El virus sincitial respiratorio humano: una panorámica. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas,* 44(2), ISSN: 0253-5688.
 - Crocker, P. y Gordon, S. 1986. Properties and distribution of a lectin-like hemagglutinin differentially expressed by murine stromal tissue macrophages. *J Exp Med.* 164, 1862–75.
 - Croft, M., Benedict, C., Ware, C. 2013. Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. *Nat Rev Drug Discov.* 12, 147–68.
 - Crowe, J. 2001a. Respiratory syncytial virus vaccine development. *Vaccine.* 20, S32–S37.
 - Crowe, J., Suara, Jr., Brock, S. 2001b. Genetic and structural determinants of virus neutralizing antibodies. *Immunol. Res.* 23, 135–145.
 - Cui, G., Zhu, R., Qian, Y., Deng, J., Zhao, L., Sun, Y., Wang, F. 2013. Genetic variation in attachment glycoprotein genes of human respiratory syncytial virus subgroups a and B in children in recent five consecutive years. *PloS one,* 8(9), e75020.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Dahlgren, M., Gustafsson-Hedberg, T., Livingston, M., Cucak, H., Alsén, S., Yrlid, U., Johansson-Lindbom, B. 2015. T follicular helper, but not Th1, cell differentiation in the absence of conventional dendritic cells. *J. Immunol.* 194, 5187–5199.
 - Dakhama, A., Vitalis, T., Hegele, R. 1997. Persistence of respiratory syncytial virus (RSV) infection and development of RSV-specific IgG1 response in a guinea-pig model of acute bronchiolitis. *Eur. Respir. J.* 10, 20–26.
 - Dawicki, W. y Watts, T. 2004. Expression and function of 4-1BB during CD4 versus CD8 T cell responses in vivo. *Eur J Immunol.* 34, 743–51.
 - De Fontbrune, F., Robin, M., Porcher, R., Scieux, C., Peffault, R., le Ferry, C., Rocha, V., Boudjedir, K., Devergie, A., Bergeron, A., Gluckman, E., Azoulay, E., Lapalu, J., Socie, G., Ribaud, P. 2007. Palivizumab Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clinical Infectious Diseases.* 45:8, 1019–1024.
 - De Palma, M., y Lewis, C. 2013. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. *Cancer Cell.* 23, 277–286.
 - De Vries, I., Krooshoop, D., Scharenborg, N., Lesterhuis, W., Diepstra, J., van Muijen, G. 2003. Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state. *Cancer Res.* 63, 12–7.
 - Delgado, M., Coviello, S., Monsalvo, A. 2009. Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease. *Nat Med.* 15(1):34 - 41.
 - Dempsey, P., Doyle, S., He, J., Cheng, G. 2003. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine & growth factor reviews.* 14(3-4), 193–209.
 - Desch, A., Gibbings, S., Goyal, R., Kolde, R., Bednarek, J., Bruno, T., Slansky, J., Jacobelli, J., Mason, R., Ito, Y., Messier, E., Randolph, G., Prabagar, M. 2016. Flow cytometric analysis of mononuclear phagocytes in non-diseased human lung and lung-draining lymph nodes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 193, 614–626.
 - Dharmadhikari, B., Wu, M., Abdullah, N. S., Rajendran, S., Ishak, N. D., Nickles, E., Harfuddin, Z., Schwarz, H. 2015. CD137 and CD137L signals are main drivers of type 1, cell-mediated immune responses. *Oncoimmunology,* 5(4), e1113367.
 - Diessenbacher, P., Hupe, M., Sprick, M., Kerstan, A., Geserick, P., Haas, T. L., Wachter, T., Neumann, M., Walczak, H., Silke, J., & Leverkus, M. 2008. NF-kappaB inhibition reveals differential mechanisms of TNF versus TRAIL-induced apoptosis

upstream or at the level of caspase-8 activation independent of cIAP2. *J investigative dermatology*, 128(5), 1134–1147.

- Drenkard, D., Becke, F., Langstein, J., Spruss, T., Kunz-Schughart, L., Tan, T. 2007. CD137 is expressed on blood vessel walls at sites of inflammation and enhances monocyte migratory activity. *FASEB J.* 21, 456–63.
- Eiros, J., Ortiz de Lejarazu, R., Tenorio, A., Casas, I., Pozo, F., Ruiz G. 2009. Diagnóstico microbiológico de las infecciones virales respiratorias. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 27, 168–177.
- Elpek, K., Yolcu, E., Franke, D., Lacelle, C., Schabowsky, R., Shirwan, H. 2007. Ex vivo expansion of CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory cells based on synergy between IL-2 and 4-1BB signaling. *J Immunol.* 179, 7295–304.
- Evans, J., Cane, P., Pringle, C. 1996. Expression and characterization of the NS1 and NS2 proteins of respiratory syncytial virus. *Virus Res.* 43, 155–161.
- Everard, M., Swarbrick, A., Wrighttham, M., McIntyre, J., Dunkley, C., James, P., Sewell, H., Milner, A. 1994. Analysis of cells obtained by bronchial lavage of infants with respiratory syncytial virus infection. *Arch Dis Child.* 71, 428 – 432.
- Falloon, J., Ji, F., Curtis, C., Bart, S., Sheldon, E., Krieger, D., Dubovsky, F., Lambert, S., Takas, T., Villafana, T., Esser, M. 2016. A phase 1a, first-in-human, randomized study of a respiratory syncytial virus F protein vaccine with and without a toll-like receptor-4 agonist and stable emulsion adjuvant. *Vaccine*, 34(25), 2847–2854.
- Falloon, J., Yu, J., Esser, M., Villafana, T., Yu, L., Dubovsky, F., Takas, T., Levin, M., Falsey, A. 2017. An Adjuvanted, Postfusion F Protein-Based Vaccine Did Not Prevent Respiratory Syncytial Virus Illness in Older Adults. *The Journal of infectious diseases*, 216(11), 1362–1370.
- Fan, Y., Yu, Y., Shi, Y., Sun, W., Xie, M., Ge, N., Mao, R., Chang, A., Xu, G., Schneider, M., Zhang, H., Fu, S., Qin, J., Yang, J. 2010. Lysine 63-linked polyubiquitination of TAK1 at lysine 158 is required for tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1beta-induced IKK/NF-kappaB and JNK/AP-1 activation. *J biological chemistry*, 285(8), 5347–5360.
- Feldman, S.A., Hendry, R., Beeler, J. 1999. Identification of a linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G. *J Virol.* 73, 6610–6617.
- Fillatreau, S. 2014. Monocyte-derived dendritic cells identified as booster of T follicular helper cell differentiation. *EMBO Mol. Med.* 6, 574–576.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Fix, J., Galloux, M., Blondot, M., Eléouët, J. 2011. The Insertion of Fluorescent Proteins in a Variable Region of Respiratory Syncytial Virus L Polymerase Results in Fluorescent and Functional Enzymes But with Reduced Activities. *Open Virol. J.* 5, 103-108.
 - Flores-Langarica, A., Marshall, J., Bobat, S., Mohr, E., Hitchcock, J., Ross, E., Coughlan, R., Khan, M., Van Rooijen, N., Henderson, I., MacLennan, I., Cunningham, A. 2011. T-Zone localized monocytederived dendritic cells promote Th1 priming to Salmonella. *Eur. J. Immunol.* 41, 2654–2665.
 - Freeman, B., Raué, H., Hill, A., Slifka, M. 2015. Cytokine-Mediated Activation of NK Cells during Viral Infection. *J of virol*, 89(15), 7922–7931.
 - Fulginiti, V., Eller, J., Sieber, O., Joyner, J., Minamitani, M., Meiklejohn, G. 1969. Respiratory virus immunization. I. A field trial of two inactivated respiratory virus vaccines; an aqueous trivalent parainfluenza virus vaccine and an alum-precipitated respiratory syncytial virus vaccine. *American journal of epidemiology*, 89(4), 435–448.
 - Futagawa, T., Akiba, H., Kodama, T., Takeda, K., Hosoda, Y., Yagita, H., y Okumura, K. 2002. Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells. *International Immunology*. 14, 275–286.
 - Gambelli, F., Di, P., Niu, X., Friedman, M., Hammond, T., Riches, D., Ortiz, L. 2004. Phosphorylation of tumor necrosis factor receptor 1 (p55) protects macrophages from silica-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 279(3), 2020–2029.
 - García, J., Santana, Z., Zumalacárregui, L., Quintana, González, D., Furrázola, G., Cruz, O. 2013. Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en Escherichia coli. *VacciMonitor*, 22(2), 30-39.
 - Garg, H., Suri, P., Gupta, J., Talwar, G., Dubey, S. 2016. Survivin: a unique target for tumor therapy. *Cancer cell international*, 16, 49.
 - Gearhart, P. 2004. The birth of molecular immunology. *J Immunol.* 173, 4259.
 - Ghildyal, R., Hartley, C., Varrasso, A. 1999. Surfactant protein A binds to the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and neutralizes virion infectivity. *J Infect. Dis.* 180, 2009–2013.
 - Ghildyal, R., Mills, J., Murray, M., Vardaxis, N., Meanger, J. 2002. Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells. *J Gen. Virol.* 83, 753–757.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Ghosh, C., Hong, B., Batabyal, S., Jeon, T., Yang, S., Hwang, S. 2014. Anti-inflammatory activity of the ethanol extract of *Dictamnus dasycarpus* leaf in lipopolysaccharide-activated macrophages. *BMC complementary and alternative medicine*, 14, 330.
 - Gill, M., Long, K., Kwon, T., Muniz, L., Mejias, A., Connolly, J., Roy, L., Banchereau, J., Ramilo, O. 2008. Differential recruitment of dendritic cells and monocytes to respiratory mucosal sites in children with influenza virus or respiratory syncytial virus infection. *J Infect Dis.* 198, 1667–1676
 - Gill, M., Palucka, A., Barton, T., Ghaffar, F., Jafri, H., Banchereau, J., Ramilo, O. 2005. Mobilization of plasmacytoid and myeloid dendritic cells to mucosal sites in children with respiratory syncytial virus and other viral respiratory infections. *J Infect Dis.* 191, 1105–1115.
 - Glezen, W., Paredes, A., Allison, J., Taber, L., Frank, A. 1981. Risk of respiratory syncytial virus infection for infants from low-income families in relationship to age, sex, ethnic group, and maternal antibody level. *The Journal of Pediatrics*, 98(5), 708–715.
 - González, L., Ruiz, M., García, M., Calder, L., López, M., Albar, J., Skehel, J., Wiley, D., Melero, J. 2001. Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci.* 98(17): 9859–9864).
 - Gopal, G., y Kumar, A. 2013. Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. *The Protein Journal.* 32;6, 419–425.
 - Graham, B., Johnson, T., Peebles, R. 2000. Immune-mediated disease pathogenesis in respiratory syncytial virus infection. *Immunopharmacology.* 48, 237–247.
 - Graham, B., Rutigliano, J., Johnson, T. 2002. Respiratory syncytial virus immunobiology and pathogenesis. *Virology.* 297, 1–7.
 - Grakoui, A., Bromley, S., Sumen, C. 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science.* 285, 221–7.
 - Green, L., Wagner, D., Glogowski, J., Skipper, P., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal biochem*, 126(1), 131–138.
 - Griesse, M. 2002. Respiratory syncytial virus and pulmonary surfactant. *Viral Immunol.* 15, 357–363.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Guerrero-Plata, A., Ortega, E., Gomez, O. 2001. Persistence of respiratory syncytial virus in macrophages alters phagocytosis and pro-inflammatory cytokine production. *Viral Immunol.* 14, 19–30.
 - Guerrero-Plata, A., Ortega, E., Orti, V. 2004. Antigen presentation by a macrophage-like cell line persistently infected with respiratory syncytial virus. *Virus Res.* 99, 95–100.
 - Gunzer, M., Schafer, A., Borgmann, S., Grabbe, S., Zanker, S., Brocker, E. 2000. Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity.* 13, 323–32.
 - Haas, T., Emmerich, C., Gerlach, B., Schmukle, A., Cordier, S., Rieser, E., Feltham, R., Vince, J., Warnken, U., Wenger, T., Koschny, R., Komander, D., Silke, J., Walczak, H. 2009. Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction. *Molecular cell.* 36(5), 831–844.
 - Habelhah, H., Takahashi, S., Cho, S., Kadoya, T., Watanabe, T., Ronai, Z. 2004. Ubiquitination and translocation of TRAF2 is required for activation of JNK but not of p38 or NF-kappaB. *EMBO J.* 23(2), 322–332.
 - Haeberle, H., Takizawa, R., Casola, A. 2002. Respiratory syncytial virus-induced activation of nuclear factor-kappaB in the lung involves alveolar macrophages and toll-like receptor 4-dependent pathways. *J Infect. Dis.* 186, 1199–1206.
 - Halfhide, C., Flanagan, B., Brearey, S., Hunt, J., Fonceca, A., McNamara, P., Howarth, D., Edwards, S., Smyth, R. 2011. Respiratory syncytial virus binds and undergoes transcription in neutrophils from the blood and airways of infants with severe bronchiolitis. *J Infect. Dis.* 204, 451– 458.
 - Hall, C., Walsh, E., Long, C., Schnabel, K. 1991. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. *The Journal of infectious diseases,* 163(4), 693–698.
 - Halstead, S. 1982. Immune enhancement of viral infection. *Prog Allergy.* 31:301 - 364.
 - Halstead, S. y O'Rourke, E. 1977. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med.* 146(1):201 - 217.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Halstead, S., O'Rourke, E., Allison, A. 1977. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. II. Identity of blood and tissue leukocytes supporting in vitro infection. *J Exp Med.* 146(1):218 - 229.
 - Han, J., Lee, J. D., Bibbs, L., Ulevitch, R. 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, 265(5173), 808–811.
 - Han, R., Song, Y., Sun, S., Zhou, Q., Chen, X., Zheng, Q., Cheng, H. 2018. Influence of Human Papillomavirus E7 Oncoprotein on Maturation and Function of Plasmacytoid Dendritic Cells In Vitro. *Virologica Sinica*, 33(6), 493–501.
 - Hashimoto, K., Ishibashi, K., Ishioka, K., Zhao, D., Sato, M., Ohara, S., Abe, Y., Kawasaki, Y., Sato, Y., Yokota, S., Fujii, N., Peebles, R., Hosoya, M., Suzutani, T. 2009. RSV replication is attenuated by counteracting expression of the suppressor of cytokine signaling (SOCS) molecules. *Virology*, 391(2), 162–170.
 - Haynes, L., Moore, E., Kurt-Jones, E., Finberg, R., Anderson, L., Tripp, R. 2001. Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *J Virol.* 75, 10730–10737.
 - Hefti, M., Van Vugt-Van der Toorn, C., Dixon, R., Vervoort, J. 2001. A novel purification method for histidine-tagged proteins containing a thrombin cleavage site. *Analytical biochemistry*, 295(2), 180–185.
 - Henderson, G., Murray, J., Yeo, R. 2002. Sorting of the Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein into Detergent-Resistant Structures Is Dependent on Cell-Surface Expression of the Glycoproteins. *Virology*, 300, 244–254.
 - Hendriks, J., Xiao, Y., Borst, J. 2003. CD27 promotes survival of activated T cells and complements CD28 in generation and establishment of the effector T cell pool. *The Journal of experimental medicine*, 198(9), 1369–1380.
 - Hixon, J., Blazar, B., Anver, M., Wiltrot, R., Murphy, W. 2001. Antibodies to CD40 induce a lethal cytokine cascade after syngeneic bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 7, 136–43.
 - Huang, Y., Collins, P., Wertz, G. 1985. Characterization of the 10 proteins of human respiratory syncytial virus: identification of a fourth envelope-associated protein. *Virus Res.* 2, 157–173.
 - Hull, J., Rowlands, K., Lockhart, E. 2003. Variants of the chemokine receptor CCR5 are associated with severe bronchiolitis caused by respiratory syncytial virus. *J Infect. Dis.* 188, 904–907.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Hussell, T., Baldwin, C., O'Garra, A. 1997. CD8+ T cells control Th2-driven pathology during pulmonary respiratory syncytial virus infection. *Eur J Immunol.* 27, 3341–3349.
 - Ichijo H. 1999. From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene*, 18(45), 6087–6093.
 - Jaguin, M., Houlbert, N., Fardel, O., Lecureur, V. 2013. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell Immunol.* 281, 51–61.
 - Jakubzick, C., Gautier, E., Gibbings, S., Sojka, D., Schlitzer, A., Johnson, T., Ivanov, S., Duan, Q., Bala, S., Condon, T., Rooijen N., Grainger, J., Belkaid, Y., Ma'ayan, A. 2013. Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity.* 39, 599–610.
 - Jakubzick, C., Randolph, G., Henson, P. 2017. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nature.* 17, 349-362.
 - Jang, I., Lee, Z., Kim, Y., Kim, S., Kwon, B. 1998. Human 4-1BB (CD137) signals are mediated by TRAF2 and activate nuclear factor-κB. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 242, 613–620.
 - Jenkins, S., Ruckerl, D., Thomas, G., Hewitson, J., Duncan, S., Brombacher, F. 2013. IL-4 directly signals tissue-resident macrophages to proliferate beyond homeostatic levels controlled by CSF-1. *J Exp Med.* 210, 2477–91.
 - Jiang, D. y Schwarz, H. 2010. Regulation of granulocyte and macrophage populations of murine bone marrow cells by G-CSF and CD137 protein. *PLoS One.* 5, 15565.
 - Jiang, D., Yue, P., Drenkard, D., Schwarz. H. 2008. Induction of proliferation and monocytic differentiation of human CD34+ cells by CD137 ligand signaling. *Stem Cells.* 26, 2372–2381.
 - Johnson, J., Gonzales, R., Olson, S., Wright, P., Graham, B. 2007. The histopathology of fatal untreated human respiratory syncytial virus infection. *Modern Pathol.* 20, 108 –119.
 - Johnson, P., Spriggs, M., Olmsted, R., Collins, P. 1987. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc Natl Acad Sci.* 84, 5625–9.
 - Joncas, J., Berthiaume, L., Pavilanis, V. 1969. The structure of the respiratory syncytial virus. *Virology.* 38, 493–496.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Jones, K., Kim, S., Keasling, J. 2000. Low-copy plasmids can perform as well as or better than high-copy plasmids for metabolic engineering of bacteria. *Metabolic Engineering*. 2, 328-338.
 - Ju, S., Park, S., Lee, S., Kwon, B., Kim, B. 2007. Marked expansion of CD11c+CD8+ T-cells in melanoma-bearing mice induced by anti-4-1BB monoclonal antibody. *Mol Cells*. 24, 32–8.
 - Jung, I., Choi, J., Jin, J., Jeong, S., Jeon, S., Lim, C., Lee, M., Yoo, J., Sonn, S. K., Kim, Y., Choi, B., Kwon, B., Seoh, J., Lee, C., Kim, D., Oh, G. 2014. CD137-inducing factors from T cells and macrophages accelerate the destabilization of atherosclerotic plaques in hyperlipidemic mice. *FASEB journal*, 28(11), 4779–4791.
 - Kalica, A., Wright, P., Hetrick, F., Chanock, R. 1973. Electron microscopic studies of respiratory syncytial temperature-sensitive mutants. *Arch Gesamte Virusforsch*. 41(3):248–258.
 - Kaminski, W., Beham, A., Kzhyshkowska, J., Gratchev, A., Puellmann, K. 2013. On the horizon: flexible immune recognition outside lymphocytes. *Immunobiology*. 218, 418–26.
 - Kang, Y., Kim, S., Shimada, S., Otsuka, M., Seit, A., Kwon, B., Watts, T., Han, J. 2007. Cell surface 4-1BBL mediates sequential signaling pathways ‘downstream’ of TLR and is required for sustained TNF production in macrophages. *Nat Immunol*. 8, 601–609.
 - Kapikian, A., James, H., Kelly, S. 1969a. Isolation from man of “avian infectious bronchitis virus-like” viruses (coronaviruses) similar to 229E virus, with some epidemiological observations. *J Infect. Dis*. 119, 282–290.
 - Kapikian, A., Mitchell, R., Chanock, R., Shvedoff, R., Stewart, C. 1969b. An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. *American journal of epidemiology*, 89(4), 405–421.
 - Karron, R., Luongo, C., Thumar, B., Loehr, K., Englund, J., Collins, P., Buchholz, U. 2015. A gene deletion that up-regulates viral gene expression yields an attenuated RSV vaccine with improved antibody responses in children. *Science translational medicine*, 7(312), 312ra175.
 - Kerrin, A., Fitch, P., Errington, C., Kerr, D., Waxman, L., Riding, K., McCormack, J., Mehendele, F., McSorley, H., MacKenzie, K., Wronski, S., Braun, A., Levin, R.,

Thielen, U., Schwarze, J. 2016. Differential lower airway dendritic cell patterns may reveal distinct endotypes of RSV bronchiolitis. *Pediatric lung disease*. 1–8.

- Kilinc, M., Mukundan, L., Yolcu, E., Singh, N., Suttles, J., Shirwan, H. 2006. Generation of a multimeric form of CD40L with potent immunostimulatory activity using streptavidin as a chaperon. *Exp Mol Pathol*. 80, 252–61.
- Killikelly, A., Kanekiyo, M., Graham, B. 2016. Pre-fusion F is absent on the surface of formalin-inactivated respiratory syncytial virus. *Scientific reports*, 6, 34108.
- Kim, H., Canchola, J., Brandt, C., Pyles, G., Chanock, R., Jensen, K., Parrott, R. 1969. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *American journal of epidemiology*, 89(4), 422–434.
- Kim, J., Choi, S., La, S., Seo, J., Kim, K., Nam, S. 2003. Constitutive expression of 4-1BB on T cells enhances CD4+ T cell responses. *Exp Mol Med*. 35, 509–17.
- Kim, J., Lee, E., Quang, N., Cho, H., Kwon, B. 2011. Recombinant TAT-CD137 Ligand Cytoplasmic Domain Fusion Protein Induces the Production of IL-6 and TNF- α in Peritoneal Macrophages. *Immune network*, 11(4), 216–222.
- Kim, T. y Braciale, T. 2009. Respiratory dendritic cell subsets differ in their capacity to support the induction of virus-specific cytotoxic CD8+ T cell responses. *PLoS ONE*. 4, e4204.
- Kim, Y., Choi, B., Kang, W., Kim, K., Kang, S., Mellor, A. 2009a. IFN-gamma-indoleamine-2,3 dioxygenase acts as a major suppressive factor in 4-1BB-mediated immune suppression in vivo. *J Leukoc Biol*. 85, 817–25.
- Kim, Y., Kim, H., Kim, H., Lee, H., Ju, S., Choi, B. 2009b. Expression of 4-1BB and 4-1BBL in thymocytes during thymus regeneration. *Exp Mol Med*. 41, 896–911.
- Kollet, J. y Petro, T. 2006. IRF-1 and NF-kappaB p50/cRel bind to distinct regions of the proximal murine IL-12 p35 promoter during costimulation with IFN-gamma and LPS. *Mol Immunol*, 43(6), 623–633.
- Komander, D. y Rape, M. 2012. The ubiquitin code. *Annual review of biochemistry*. 81, 203–229.
- Krilov, L.R., L.J. Anderson, L. Marcoux. 1989. Antibody-mediated enhancement of respiratory syncytial virus infection in two monocyte/macrophage cell lines. *J Infect. Dis*. 160, 777–782.
- Krzyzaniak, M., Zumstein, M., Gerez, J., Picotti, P., Helenius, A. 2013. Host Cell Entry of Respiratory Syncytial Virus Involves Macropinocytosis Followed by Proteolytic Activation of the F Protein. *PLoS Pathog*. 9, 4, e1003309.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Kuang, Y., Weng, X., Liu, X., Zhu, H., Chen, Z., Chen, H. 2012. Effects of 4-1BB signaling on the biological function of murine dendritic cells. *Oncol Lett.* 3, 477–81.
 - Kumar, P., Nagarajan, A., Uchil, P. 2018. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor protocols*, 2018(6), 10.1101/pdb.prot095505.
 - Kurt-Jones, E., Popova, L., Kwinn, L. 2000. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat. Immunol.* 1, 398–401.
 - Kwon, B. y Weissman, S. 1989. cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86.
 - Lamb, R. 1993. Paramyxovirus Fusion: A Hypothesis for Changes. *Virology* 197:1, 1–11.
 - Lamb, R. y Jardetzky, T. 2007. Structural basis of viral invasion: Lessons from paramyxovirus. *Curr Opin Struct Biol.* 17, 427–436.
 - Lambert, L., Sagfors, A., Openshaw, P., Culley, F. 2014. Immunity to RSV in Early-Life. *Frontiers in immunology*, 5, 466.
 - Langlet, C., Tamoutounour, S., Henri, S., Luche, H., Ardouin, L., Grégoire, C., Malissen, B., Guilliams, M. 2012. CD64 expression distinguishes monocyte-derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization. *J Immunol.* 188, 1751–1760.
 - Langley, J., Aggarwal, N., Toma, A., Halperin, S., McNeil, S., Fissette, L., Dewé, W., Leyssen, M., Toussaint, J., Dieussaert, I. 2017. A Randomized, Controlled, Observer-Blinded Phase 1 Study of the Safety and Immunogenicity of a Respiratory Syncytial Virus Vaccine With or Without Alum Adjuvant. *The Journal of infectious diseases*, 215(1), 24–33.
 - Lara, A. 2011. Producción de proteínas recombinantes en Escherichia coli. *Revista mexicana de ingeniería química.* 10, 209-223.
 - Lee, H., Nam, K., Seo, S., Kim, Y., Kang, H., Kwon, B. 2003. 4-1BB cross-linking enhances the survival and cell cycle progression of CD4 T lymphocytes. *Cell Immunol.* 223, 143–50.
 - Lee, H., Park, S., Choi, B., Kim, H., Nam K., Kwon, B. 2002. 4-1BB promotes the survival of CD8+ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1. *J Immunol.* 169, 4882–8.
 - Lee, S., Park, Y., Eun, S., Madireddi, S., Cheroutre, H., Croft, M. 2012. Cutting edge: 4-1BB controls regulatory activity in dendritic cells through promoting optimal expression of retinal dehydrogenase. *J Immunol.* 189, 2697–701.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Lee, Y., Lee, H., Kang, H., Kwak, J., Bae, Y. 2004. Phosphatidic acid positively regulates LPS-induced differentiation of RAW264.7 murine macrophage cell line into dendritic-like cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 318, 839–45.
 - Legrand, F., Driss, V., Woerly, G., Loiseau, S., Hermann, E., Fournie, J. 2009. A functional gammadeltaTCR/CD3 complex distinct from gammadeltaT cells is expressed by human eosinophils. *PLoS One.* 4, e5926.
 - Lehmann, M., Torres, L., Price, P., Brandmüller, C., Kirschning, C., Sutter, G. 2016. CCL2 expression is mediated by type I IFN receptor and recruits NK and T cells to the lung during MVA infection. *J Leukoc Biol.* 99,6:1057-64.
 - Leon, B., Lopez-Bravo, M., Ardavin, C. 2007. Monocytederived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. *Immunity* 26, 519–531.
 - Leroux-Roels, G., De Boever, F., Maes, C., Nguyen, T., Baker, S., Gonzalez Lopez, A. 2019. Safety and immunogenicity of a respiratory syncytial virus fusion glycoprotein F subunit vaccine in healthy adults: Results of a phase 1, randomized, observer-blind, controlled, dosage-escalation study. *Vaccine*, 37(20), 2694–2703.
 - Levine, S., Klaiber, R., Paradiso, P. 1987. Demonstration that Glycoprotein G Is the Attachment Protein of Respiratory Syncytial Virus. *J. gen. Virol.* 68, 2521-2524.
 - Li, F., Aljahdali, I., Ling, X. 2019b. Cancer therapeutics using survivin BIRC5 as a target: what can we do after over two decades of study?. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 38(1), 368.
 - Li, F., Yang, J., Ramnath, N., Javle, M., Tan, D. 2005. Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: what is the significance?. *International journal of cancer*, 114(4), 509–512.
 - Li, S., Gong, P., Zhang, N., Li, X., Tai, L., Wang, X., Yang, Z., Yang, J., Zhu, X., Zhang, X., Li, J. 2019a. 14-3-3 Protein of *Neospora caninum* Modulates Host Cell Innate Immunity Through the Activation of MAPK and NF-κB Pathways. *Frontiers in microbiology*, 10, 37.
 - Li, S., Wang, W., Fu, S., Wang, J., Liu, H., Xie, S. 2013. IL-21 modulates release of proinflammatory cytokines in LPS-stimulated macrophages through distinct signaling pathways. *Mediators Inflamm.* 2013, 548073.
 - Li, X., Peng, H., Wu, Y., Xu, Y. 2018. Brain Natriuretic Peptide-Regulated Expression of Inflammatory Cytokines in Lipopolysaccharide (LPS)-Activated Macrophages via NF-κB and Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) Pathways. *Medical science*

monitor : international medical journal of experimental and clinical research, 24, 3119–3126.

- Lieber, M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W., & Todaro, G. (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *International journal of cancer*. 17(1), 62–70.
- Liechtenstein, T., Dufait, I., Lanna, A., Breckpot, K., Escors, D. 2012. Modulating co-stimulation during antigen presentation to enhance cancer immunotherapy. *Immunology, endocrine & metabolic agents in medicinal chemistry*. 12(3), 224–235.
- Lim, J., Thomas, T. y Cavicchioli, R. 2000. Low temperature regulated DEAD-box RNA helicase from the antarctic archaeon, *Methanococcoides burtonii*. *J Mol. Bio.* 297, 553-567.
- Liu, Y., Chen, S., Pan, B., Guan, Z., Yang, Z., Duan, L., Cai, H. 2016. A subunit vaccine based on rH-NS induces protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection by inducing the Th1 immune response and activating macrophages. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 48(10), 909–922.
- Liuzzi, M., Mason, S., Cartier, M., Lawetz, C., McCollum, R., Dansereau, N., Bolger, G., Lapeyre, N., Gaudette, Y., Lagacé, L., Massariol, M., Dô, F., Whitehead, P., Lamarre, L., Scouten, E., Bordeleau, J., Landry, S., Rancourt, J., Fazal, G., Simoneau B. 2005. Inhibitors of Respiratory Syncytial Virus Replication Target Cotranscriptional mRNA Guanylylation by Viral RNA-Dependent RNA Polymerase. *J Virol.* 79:20, 13105–13115.
- Livak, K. y Schmittgen, T. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402–408.
- Lo, M., Brazas, R., Holtzman, M. 2005. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 mediate inhibition of Stat2 expression and alpha/beta interferon responsiveness. *J Virol*, 79(14), 9315–9319.
- Locksley, R., Killeen, N., Lenardo, M. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 104(4), 487–501.
- López, J., John, S., Tenev, T., Rautureau, G., Hinds, M., Francalanci, F., Wilson, R., Broemer, M., Santoro, M., Day, C., y Meier, P. 2011. CARD-mediated autoinhibition of cIAP1's E3 ligase activity suppresses cell proliferation and migration. *Molecular cell*, 42(5), 569–583.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Lotz, M. y Peebles, R. 2012. Mechanisms of respiratory syncytial virus modulation of airway immune responses. *Current allergy and asthma reports*, 12(5), 380–387.
 - Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V. 2012. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 380, 2095-128.
 - Lu, J., C. Teh, U. Kishore. 2002. Collectins and ficolins: sugar pattern recognition molecules of the mammalian innate immune system. *Biochim. Biophys.* 1572, 387–400.
 - Ma, J., Bang, B., Lu, J., Eun, S., Otsuka, M., Croft, M., Tobias, P., Han, J., Takeuchi, O., Akira, S., Karin, M., Yagita, H., Kang, Y. 2013. The TNF family member 4-1BBL sustains inflammation by interacting with TLR signaling components during late-phase activation. *Science signaling*, 6(295), ra87.
 - Mack, D., Lanham, A., Palmer, B., Maier, L., Watts, T., Fontenot, A. 2008. 4-1BB enhances proliferation of beryllium-specific T Cells in the lung of subjects with chronic beryllium disease. *J Immunol*. 181, 4381–4388.
 - Madireddi, S., Schabowsky, R., Srivastava, A. 2012. SA-4-1BBL costimulation inhibits conversion of conventional CD4+ T cells into CD4+ FoxP3+ T regulatory cells by production of IFN-gamma. *PLoS One*. 7, e42459.
 - Madonna, G., Ullman, C., Gentilcore, G., Palmieri, G., Ascierto, P. 2012. NF-κB as potential target in the treatment of melanoma. *Journal of translational medicine*, 10, 53.
 - Magro, M. 2012. Neutralizing antibodies against the preactive form of respiratory syncytial virus fusion protein offer unique possibilities for clinical intervention. *Proc Natl Acad Sci*. 109, 3089–3094.
 - Malinczak, C., Schuler, C., Duran, A., Rasky, A., Mire, M., Núñez, G., Lukacs, N., Fonseca, W. 2021. NLRP3-Inflammasome Inhibition during Respiratory Virus Infection Abrogates Lung Immunopathology and Long-Term Airway Disease Development. *Viruses*, 13(4), 692.
 - Mantovani A. y Allavena, P. 2015. The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. *J Exp. Med.* Vol. 212 No. 4, 435–445.
 - Mantovani, A., B. Bottazzi, F. Colotta, S. Sozzani, and L. Ruco. 1992. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol. Today*. 13, 265–270.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Martínez, F., Sica, A., Mantovani, A., Locati, M. 2008. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 13, 453–61.
 - Martínez, I. y Melero, J. 2000. Binding of human respiratory syncytial virus to cells: implication of sulfated cell surface proteoglycans. *J Gen. Virol.* 81, 2715–2722.
 - Martínez-Forero, I., Azpilikueta, A., Bolanos-Mateo, E., Nistal-Villan, E., Palazon, A., Teijeira, A., Perez-Chacon, G. 2013. T cell costimulation with anti-CD137 monoclonal antibodies is mediated by K63-polyubiquitin-dependent signals from endosomes. *J Immunol.* 190, 6694–6706.
 - Marty, A., Meanger, J., Mills, J., Shields, B., Ghildyal, R. 2004. Association of matrix protein of respiratory syncytial virus with the host cell membrane of infected cells. *Arch. Virol.* 149: 199–210.
 - Masi, M., Pagès, J., & Pradel, E. 2003. Overexpression and purification of the three components of the Enterobacter aerogenes AcrA-AcrB-TolC multidrug efflux pump. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 786(1-2), 197–205.
 - Matthews, J., Young, T., Tucker, S., Mackay, J. 2000. The Core of the Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Is a Trimeric Coiled Coil. *J. Virol.* 5911-5920.
 - McPherson, A., Snell, L., Mak, T., Watts, T. 2012. Opposing roles for TRAF1 in the alternative versus classical NF- κ B pathway in T cells. *J Biological Chemistry.* 287(27), 23010–23019.
 - Medzhitov, R., Janeway, C. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current Opinion in Immunology.* 9:1, 4–9.
 - Mei, Z., Chen, X. , Hu, S., Wang, N., Ou, X., Wang, J., Luo, H., Liu, J., Jiang, Y. 2016. Kelch-like Protein 21 (KLHL21) Targets I κ B Kinase- β to Regulate Nuclear Factor κ -Light Chain Enhancer of Activated B Cells (NF- κ B) Signaling Negatively. *The Journal of biological chemistry*, 291(35), 18176–18189.
 - Melero, I., Murillo, O., Dubrot, J., Hervas-Stubbs, S. and Perez-Gracia, J. 2008. Multi-layered action mechanisms of CD137 (4-1BB)-targeted immunotherapies. *Trends Pharmacol. Sci.* 2008. 29, 383–390.
 - Midulla, F., Villani, A., Panuska, J., Dab, I., Kolls, J., Merolla, R., Ronchetti, R. 1993. Respiratory syncytial virus lung infection in infants: immunoregulatory role of infected alveolar macrophages. *J Infect Dis.* 168, 1515–1519.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Miki, H., Han, K., Scott, D., Croft, M., Kang, Y. 2020. 4-1BBL Regulates the Polarization of Macrophages, and Inhibition of 4-1BBL Signaling Alleviates Imiquimod-Induced Psoriasis. *J Immunol*, 204(7), 1892–1903.
 - Mills, C., Kincaid, K., Alt, J., Heilman, M., Hill, A. 2000. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*. 164(12), 6166–73.
 - Mink, M., Stec, D., Collins, P. 1991. Nucleotide sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. *Virology*. 185, 2, 615–24.
 - Miroux, B., Walker, J. 1996. Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol*, 260(3), 289–298.
 - Mitraki, A., Fane, B., Haase-Pettingell, C., Sturtevant, J., King, J. 1991. Global suppression of protein folding defects and inclusion body formation. *Science*, 253(5015), 54–58.
 - Mittler, R., Foell, J., McCausland, M., Strahotin, S., Niu, L., Bapat, A., Hewes, L. 2004. Anti-CD137 antibodies in the treatment of autoimmune disease and cancer. *Immunol Res*. 29(1-3), 197-208.
 - Moghaddam A, Olszewska W, Wang B. 2006. A potential molecular mechanism for hypersensitivity caused by formalin-inactivated vaccines. *Nat Med*. 12(8):905 - 907.
 - Moran, A., Kovacsics-Bankowski, M., Weinberg, A. 2013. The TNFRs OX40, 4-1BB, and CD40 as targets for cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 25, 230–7.
 - Morris, J., Blount, R., Savage, R. 1956. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med*. 92, 544–550.
 - Moxley, G. 1989. Heightened sensitivity of quantitative ELISA for IgM rheumatoid factor with the use of the biotin-streptavidin system. *American journal of clinical pathology*. 92(5), 630–636.
 - Mueller, S., Gebhardt, T., Carbone, F., Heath, W. 2013. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annual review of immunology*, 31, 137–161.
 - Murphy, B., Prince, G., Walsh, E. 1986. Dissociation between serum neutralizing and glycoprotein anti- body responses of infants and children who received inactivated respiratory syncytial virus vaccine. *J. Clin. Microbiol*. 24, 197–202.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Myers, L., Lee, S., Rossi, R. 2005. Combined CD137 (4-1BB) and adjuvant therapy generates a developing pool of peptide-specific CD8 memory T cells. *Int Immunol.* 18, 325–33.
 - Nair, H., Nokes, D., Gessner, B., Dherani, M., Madhi, S., Singleton, R. 2010. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 375, 1545.
 - Nakano, H. Lin, K., Yanagita, M., Charbonneau, C., Cook, D., Kakiuchi, T., Gunn, M. 2009. Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses. *Nat. Immunol.* 10, 394–402.
 - Navarro, J., Sanbonmatsu, S., Perez, M., De La Rosa, M. 1999. Rapid Detection of Respiratory Viruses by Shell Vial Assay Using Simultaneous Culture of HEp-2, LLC-MK2, and MDCK Cells in a Single Vial. *J Clin Microbiol.* 37, 2346–7.
 - Nicholas, J., Rubino, N., Lively, M. 1990. Cytolytic T-lymphocyte responses to respiratory syncytial virus: effector cell phenotype and target proteins. *J. Virol.* 64, 4232–4241.
 - Niu L, Strahotin S, Hewes B. 2007. Cytokine-mediated disruption of lymphocyte trafficking, hemopoiesis, and induction of lymphopenia, anemia, and thrombocytopenia in anti-CD137-treated mice. *J Immunol.* 178, 4194–213.
 - Noor, A. y Krilov, L. 2018. Respiratory syncytial virus vaccine: where are we now and what comes next?. *Expert Opin Biol Ther.* 18, 1247-1256.
 - Noyola, D., Juarez-Vega, G., Monjaras-Avila, C., Escalante-Padron, F., Rangel-Ramirez, V., Cadena-Mota, S, Monsivais-Urenda, A., GarciaSepulveda, C., Gonzalez-Amaro, R. 2015. NK cell immunophenotypic and genotypic analysis of infants with severe respiratory syncytial virus infection. *Microbiol Immunol.* 59, 389 – 397.
 - Nuc, P. y Nuc, K. 2006. Produkcja rekombinowanych białek w Escherichia coli. *Postępy Biochem.* 52, 448-456.
 - Nurieva, R., Thomas, S., Nguyen, T., Martin-Orozco, N., Wang, Y., Kaja, M. K., Yu, X. Z., Dong, C. 2006. T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals. *EMBO J.* 25(11), 2623–2633.
 - O'Donnell, D. y Carrington D. 2002. Peripheral blood lymphopenia and neutrophilia in children with severe respiratory syncytial virus disease. *Pediatr Pulmonol.* 34, 128 –130.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- O'Farrell, A., Liu, Y., Moore, K., Mui, A. 1988. IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways. *EMBO J.* 17, 1006–18.
 - Okamoto, T., Gohil, K., Finkelstein, E., Bove, P., Akaike, T., van der Vliet, A. 2004. Multiple contributing roles for NOS2 in LPS-induced acute airway inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 286, 198–209.
 - Olmsted, R. y Collins, P. 1989. The 1A Protein of Respiratory Syncytial Virus Is an Integral Membrane Protein Present as Multiple, Structurally Distinct Species. *J Virol.* 2019-2019.
 - Openshaw, P. 1995. Immunopathological mechanisms in respiratory syncytial virus disease. Springer Semin. *Immunopathol.* 17, 187–201.
 - Openshaw, P. 2002. Potential therapeutic implications of new insights into respiratory syncytial virus disease. *BioMed Central.* 1465-992.
 - Pähler, A., Hendrickson, W., Kolks, M., Argaraña, C., Cantor, C. 1987. Characterization and crystallization of core streptavidin. *J Biol Chem.* 262(29), 13933–13937.
 - Panuska, J., Hertz, M., Taraf, H., Villani, A., Cirino, N. 1992. Respiratory syncytial virus infection of alveolar macrophages in adult transplant patients. *Am Rev Respir Dis.* 145, 934 –939.
 - Park, E. y , Lee, H. 2020. Immunomodulatory effects of fermented *Platycodon grandiflorum* extract through NF- κ B signaling in RAW 264.7 cells. *Nutrition research and practice*, 14(5), 453–462.
 - Peret, T., Hall, C., Hammond, C. 2000. Circulation patterns of group A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America. *J Infect. Dis.* 181, 1891–1896.
 - Piedimonte, G. y Perez, M. 2014. Respiratory syncytial virus infection and bronchiolitis. *Pediatrics in review.* 35(12), 519–530.
 - Polack, F., Teng, M., Collins, P. 2002. A role for immune complexes in enhanced respiratory syncytial virus disease. *J Exp. Med.* 196, 859–865.
 - Pollizzi, K. y Powell, J. 2014. Integrating canonical and metabolic signalling programmes in the regulation of T cell responses. *Nat Rev Immunol.* 14, 435–46.
 - Pollok, K., Kim, Y., Hurtado, J., Zhou, Z., Kim, K., Kwon, B. 1994. 4-1BB T-cell antigen binds to mature B cells and macrophages, and costimulates anti-mu-primed splenic B cells. *European journal of immunology*, 24(2), 367–374.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Porowińska, D., Wujak, M., Roszek, K., Komoszyński, M. 2013. Prokaryotic expression systems. *Postepy Hig Med Dosw.* 1;67, 119-29.
 - Porta, C., Rimoldi, M., Raes, G., Brys, L., Ghezzi, P., Di Liberto, D. 2009. Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappaB. *Proc Natl Acad Sci.* 106, 14978–83.
 - Porterfield, J. 1982. Immunological enhancement and the pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. *The Journal of hygiene.* 89(3), 355–364.
 - Prior, J., Lynch, M., Gill, R. 2010. Broad-host-range vectors for protein expression across Gram negative hosts. *Biotechnol. Bioeng.* 106, 326-332.
 - Puellmann, K., Kaminski, W., Vogel, M., Nebe, C., Schroeder, J., Wolf, H., 2006. A variable immunoreceptor in a subpopulation of human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci.* 103, 14441–6.
 - Pulle G, Vidric M, Watts T. H. 2006. IL-15-dependent induction of 4-1BB promotes Ag-independent CD8 memory T cell survival. *J Immunol.* 176:2739–2748.
 - Raes, G., De Baetselier, P., Noel, W., Beschin, A., Brombacher, F., Hassanzadeh, Gh. 2002. Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *J Leukoc Biol.* 71, 597–602.
 - Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R., Davis, R. 1995. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *The J biological chemistry,* 270(13), 7420–7426.
 - Ralph, P. y Nakoinz, I. 1975. Phagocytosis and cytolysis by amacrophage tumour and its cloned cell line. *Nature.* 257, 393–4.
 - Ralph, P., Moore, M., Nilsson, K. 1976. Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J Exp Med.* 143(6), 1528–1533.
 - Raschke, W., Baird, S., Ralph, P., Nakoinz, I. 1978. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell.* 15, 261–7.
 - Rima, B., Collins, P., Easton, A., Fouchier, R., Kurath, G., Lamb, R., Lee, B., Maisner, A., Rota, P., Wang, L., ICTV Report Consortium. 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: Pneumoviridae. *J Gen Virol,* 98, 2912–2913.
 - Rincón, M., Enslin, H., Raingeaud, J., Recht, M., Zapton, T., Su, M. S., Penix, L. A., Davis, R. J., Flavell, R. 1998. Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *The EMBO journal,* 17(10), 2817–2829.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Robertson, S., Messer, R., Carmody, A., Mittler, R., Burlak, C., Hasenkrug K. 2008. CD137 costimulation of CD8+ T cells confers resistance to suppression by virus-induced regulatory T cells. *J Immunol.* 180, 5267–74.
 - Rosano, G., y Ceccarelli, E. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*, 5, 172.
 - Russell, C., Unger, S., Walton, M., Schwarze, J. 2017. The human immune response to respiratory syncytial virus infection. *Clin Microbiol Rev.* 30, 481–502.
 - Sabbagh, L., Andreeva, D., Laramée, G., Oussa, N., Lew, D., Bisson, N., Soumounou, Y., Pawson, T., Watts, T. 2013. Leukocyte-specific protein 1 links TNF receptor-associated factor 1 to survival signaling downstream of 4-1BB in T cells. *J of leukocyte biology*, 93(5), 713–721.
 - Sabbagh, L., Pulle, G., Liu, Y., Tsitsikov, E., Watts, T. 2008. ERK-dependent Bim modulation downstream of the 4-1BB-TRAF1 signaling axis is a critical mediator of CD8 T cell survival in vivo. *J Immunol.* 180(12), 8093–8101.
 - Sabbagh, L., Snell, L., Watts, T. 2007. TNF family ligands define niches for T cell memory. *Trends Immunol.* 28, 333–339.
 - Sallusto, F. y Lanzavecchia, A. 2000. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev.* 177, 134–40.
 - Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., Lanzavecchia, A. 1995. Dendritic cells use micropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med.* 182, 389–400.
 - Samy, N., Reichhardt, D., Schmidt, D., Chen, L., Silbernagl, G., Vidojkovic, S., Meyer, T., Jordan, E., Adams, T., Weidenthaler, H., Stroukova, D., De Carli, S., Chaplin, P. 2020. Safety and immunogenicity of novel modified vaccinia Ankara-vectored RSV vaccine: A randomized phase I clinical trial. *Vaccine*, 38(11), 2608–2619.
 - Sanchez, A., Labiano, S., Rodriguez, M., Azpilikueta, A., Etxeberria, I., Bolaños, E., Melero, I. 2016. Deciphering CD137 (4-1BB) signaling in T-cell costimulation for translation into successful cancer immunotherapy. *Er J Immunol.* 46, 513–522.
 - Sano, H., K. Nagai, H. Tsutsumi. 2003. Lactoferrin and surfactant protein A exhibit distinct binding specificity to F protein and differently modulate respiratory syncytial virus infection. *Er J Immunol.* 33, 2894–2902.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Saoulli, K., Lee, S., Cannons, J. 1998. CD28-independent, TRAF2-dependent costimulation of resting T cells by 4-1BB ligand. *J Exp Med.* 187, 1849–62.
 - Saxena, R., Vallyathan, V., Lewis, D. 2003. Evidence for lipopolysaccharide-induced differentiation of RAW264.7 murine macrophage cell line into dendritic like cells. *J Biosci.* 28, 129–34.
 - Sayadi, S., Barbotin, J., Thomas, D. 1989. Effect of environmental growth conditions on plasmid stability, plasmid copy number, and catechol 2,3-dioxygenase activity in free and immobilized *Escherichia coli* cells. *Biotechnology and Bioengineering.* 33, 801-808.
 - Schaale, K., Brandenburg, J., Kispert, A., Leitges, M., Ehlers, S., Reiling, N. 2013. Wnt6 is expressed in granulomatous lesions of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice and is involved in macrophage differentiation and proliferation. *J Immunol.* 191, 5182–95.
 - Schabowsky, R., Elpek, K., Madireddi, S. 2009. A novel form of 4-1BBL has better immunomodulatory activity than an agonistic anti-4-1BB Ab without Ab-associated severe toxicity. *Vaccine.* 2009;28, 512–522.
 - Schwarze, J., O'Donnell, A., Rohwedder, P., Openshaw. 2004. Latency and persistence of respiratory syncytial virus despite T cell immunity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 169, 801–805.
 - Schwenzer, R., Siemienski, K., Liptay, S., Schubert, G., Peters, N., Scheurich, P. 1999. The human tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 1 gene (TRAF1) is up-regulated by cytokines of the TNF ligand family and modulates TNF-induced activation of NF-kappaB and c-Jun Nterminal kinase. *J Biol Chem.* 274:19368–74.
 - Shan, J., Britton, P., King, C., Booy, R. 2021. The immunogenicity and safety of respiratory syncytial virus vaccines in development: A systematic review. *Influenza and other respiratory viruses*, 10.1111/irv.12850. Advance online publication.
 - Sharma, R., Elpek, K., Yolcu, E., Schabowsky, R., Zhao, H., Bandura, L., Shirwan, H. 2009. Costimulation as a Platform for the Development of Vaccines: A Peptide-Based Vaccine Containing a Novel Form of 4-1BB Ligand Eradicates Established Tumors. *Cancer Res.* 15; 69, 4319–4326.
 - Sharma, R., Schabowsky, R., Srivastava, A., Elpek, K., Madireddi, S., Zhao, H., Zhong, Z., Miller, R., Macleod, K., Yolcu, E., Shirwan, H. 2010a. 4-1BB ligand as an

effective multifunctional immunomodulator and antigen delivery vehicle for the development of therapeutic cancer vaccines. *Cancer research*, 70(10), 3945–3954.

- Sharma, R., Srivastava, A., Yolcu, E., MacLeod, K., Schabowsky, R., Madireddi, S., Shirwan, H. 2010b. SA-4-1BBL as the immunomodulatory component of a HPV-16 E7 protein based vaccine shows robust therapeutic efficacy in a mouse cervical cancer model. *Vaccine*, 28(36), 5794–5802.
- Shay, D., Holman, R., Newman, R., Liu, L., Stout, J., Anderson, L. 1999. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children. *JAMA*. 282, 1440.
- Shepherd, V. 2002. Distinct roles for lung collectins in pulmonary host defense. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26, 257–260.
- Shi, T., Denouel, A., Tietjen, A., Campbell, I., Moran, E., Li, X., Campbell, H., Demont, C., Nyawanda, B., Chu, H., Stoszek, S., Krishnan, A., Openshaw, P., Falsey, A., Nair, H., RESCEU Investigators .2020. Global Disease Burden Estimates of Respiratory Syncytial Virus-Associated Acute Respiratory Infection in Older Adults in 2015: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Journal of infectious diseases*, 222(Suppl 7), S577–S583.
- Shin, S., Kim, Y., Choi, B., Kwon, P., Lee, H., Kwon, B. 2007. 4-1BB triggers IL-13 production from T cells to limit the polarized, Th1-mediated inflammation. *J Leukoc Biol.* 81, 1455–65.
- Shuford, W., Klussman, K., Tritchler, D., Loo, D., Chalupny, J., Siadak, A. 1997. 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *J Exp Med.* 186, 47–55.
- Sica, A., y Mantovani, A. 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* 122, 787–795.
- Sin, J., Kim, J., Arnold, R., Shroff, K., McCallus, D., Pachuk, C., McElhiney, S., Wolf, M., Pompa-de Bruin, S., Higgins, T., Ciccarelli, R., Weiner, D. 1999. IL-12 gene as a DNA vaccine adjuvant in a herpes mouse model: IL-12 enhances Th1-type CD4+ T cell-mediated protective immunity against herpes simplex virus-2 challenge. *J Immunol*, 162(5), 2912–2921.
- Singh-Jasuja, H., Toes, R., Spee, P., Munz, C., Hilf, N., Schoenberger, S. 2000. Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis. *J Exp Med.* 191, 1965–74.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Smith, C., Farrah, T., Goodwin, R. 1994. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell*. 76, 959.
 - Smith, P., Wang, S., Dowling, K., Forsyth, K. 2001. Leucocyte populations in respiratory syncytial virus-induced bronchiolitis. *J Paediatr. Child Health*. 37, 146 – 151.
 - Sørensen, H. 2005. Mortensen K.K.: Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of Escherichia coli. *Microb. Cell. Fact.* 4, 1-8.
 - Spann, K., Tran, K., Collins, P. 2005. Effects of Nonstructural Proteins NS1 and NS2 of Human Respiratory Syncytial Virus on Interferon Regulatory Factor 3, NF-κB, and Proinflammatory Cytokines. *J Virol*. 79:9, 5353–5362.
 - Spender, L., Hussell, T., Openshaw, P. 1998. Abundant IFN-gamma production by local T cells in respiratory syncytial virus-induced eosinophilic lung disease. *J Gen. Virol*. 79, 1751–1758.
 - Sprent, J., y Surh, C. 2002. T cell memory. *Ann Rev Immunol*. 20, 551–579.
 - Springall, R., Amezcua-Guerra. L., Gonzalez-Pacheco, H., Furuzawa-Carballeda, J., Gomez-Garcia, L., Marquez-Velasco, R. 2013. Interferon-gamma increases the ratio of matrix metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in peripheral monocytes from patients with coronary artery disease. *PLoS One*. 8, e72291.
 - Stein, R., Bont, L., Zar, H., Polack, F., Park, C., Claxton, A., Borok, G., Butylkova, Y., Wegzyn, C. 2017. Respiratory syncytial virus hospitalization and mortality: Systematic review and meta-analysis. *Pediatric pulmonology*, 52(4), 556–569.
 - Studier, F., Rosenberg, A., Dunn, J., Dubendorff, J. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in enzymology*, 185, 60–89.
 - Sujitha, S., Dinesh, P., Rasool, M. 2018. Berberine modulates ASK1 signaling mediated through TLR4/TRAF2 via upregulation of miR-23a. *Toxicology and applied pharmacology*, 359, 34–46.
 - Suntharalingam, G., Perry, M., Ward, S. 2006. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med*. 355, 1018–28.
 - Suram, S., Brown, G., Ghosh, M., Gordon, S., Loper, R., Taylor, P. 2006. Regulation of cytosolic phospholipase A2 activation and cyclooxygenase 2 expression in macrophages by the -glucan receptor. *J Biol Chem*. 281, 5506–14.
 - Swedan, S., Andrews, J., Majumdar, T., Musiyenko, A., Barik, S. 2011. Multiple Functional Domains and Complexes of the Two Nonstructural Proteins of Human

Respiratory Syncytial Virus Contribute to Interferon Suppression and Cellular Location. *J Virol.* 85:19, 10090–10100.

- Swedan, S., Musiyenko, A., Barik, S. 2009. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins decrease levels of multiple members of the cellular interferon pathways. *J Virol*, 83(19), 9682–9693.
- Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scudiero, D. A., Vigna, N., Oltersdorf, T., Reed, J. C. 1998. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer research*, 58(23), 5315–5320.
- Tawar, R., Duquerroy, S., Vonrhein, C., Varela, P., Damier, L., Castagné, N., MacLellan, N. Bedouelle, H., Bricogne, G., Bhella, D., Eléouët, J., Rey, F. Crystal 2009. Structure of a Nucleocapsid-Like Nucleoprotein-RNA Complex of Respiratory Syncytial Virus. *Science*. 326, 1279.
- Teng, M. y Collins, P. 1998. Identification of the respiratory syncytial virus proteins required for formation and passage of helper-dependent infectious particles. *J Virol.* 72:7, 5707-16.
- Teng, M., Whitehead, S., Collins., P. 2001. Contribution of the respiratory syncytial virus G glycoprotein and its secreted and membrane-bound forms to virus replication in vitro and in vivo. *Virology*. 289, 283–296.
- Terpe K. 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 211-222.
- Thomas, E., Meza-Perez, S., Bevis, K., Randall, T., Gillespie, G., Langford, C., Alvarez, R. 2016. IL-12 Expressing oncolytic herpes simplex virus promotes anti-tumor activity and immunologic control of metastatic ovarian cancer in mice. *Journal of ovarian research*, 9(1), 70.
- Thompson, W., Shay, D., Weintraub, E., Brammer, L., Cox, N., Anderson, L., Fukuda, K. 2003. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA*. 289, 179.
- Tian, Z., Dong, T., Yang, Y., Teng, D., Wang, J. 2009. Expression of antimicrobial peptide LH multimers in *Escherichia coli* C43(DE3). *Applied microbiology and biotechnology*, 83(1), 143–149.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Toshchakov, V., Jones, B., Perera, P., Thomas, K., Cody, M., Zhang, S. 2002. TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nat Immunol.* 3, 392–8.
 - Tran, T., Castagné, N., Dubosclard, V., Noinville, S., Koch, E., Moudjou, M., Henry, C., Bernard, J., Yeo, R., Eléouët, J. 2009. The Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein Forms Tetramers and Interacts with RNA and P in a Competitive Manner. *J Virol.* 83:13, 6363–6374.
 - Tripp, R. 2003. Role of cytokines in the development and maintenance of memory T cells during respiratory viral infection. *Curr. Pharm. Des.* 9, 51–59.
 - Tripp, R. 2004. Pathogenesis of respiratory syncytial virus infection. *Viral Immunol.* 17(2), 165-81.
 - Tu, T., Kim, C., Goto, T., Kawada, T., Kim, B., Yu, R. 2012. 4-1BB/4-1BBL interaction promotes obesity-induced adipose inflammation by triggering bidirectional inflammatory signaling in adipocytes/macrophages. *Mediators of inflammation*, 2012, 972629.
 - Ubol, S. y Halstead, S. 2010. How innate immune mechanisms contribute to antibody-enhanced viral infections. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 17(12), 1829–1835.
 - Underhill, D., y Ozinsky, A. 2002. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 103–110.
 - Valarcher, J., Bourhy, Lavenu, A. 2001. Persistent infection of B lymphocytes by bovine respiratory syncytial virus. *Virology.* 291, 55–67.
 - Valdez, N., Caspeta, L., Perez, N., Ramirez, O. Trujillo-Roldan, M. 2009. Production of recombinant proteins in E. coli by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. *Microbial Cell Factories.* 9, 18.
 - Van Helden, S., Krooshoop, D., Broers, K., Raymakers, R., Figdor, C., van Leeuwen, F. 2006. A critical role for prostaglandin E2 in podosome dissolution and induction of high-speed migration during dendritic cell maturation. *J Immunol.* 177, 1567–74.
 - Varga, S., Wang, X., Welsh, R., 2001. Immunopathology in RSV infection is mediated by a discrete oligoclonal subset of antigen-specific CD4(+) T cells. *Immunity.* 15, 637–646.
 - Vaux, D. L., Cory, S., Adams, J. 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 335(6189), 440–442.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Vemula, S., Sayedahmed, E., Sambhara, S., Mittal, S. 2017. Vaccine approaches conferring cross-protection against influenza viruses. *Expert review of vaccines*. 16(11), 1141–1154.
 - Vinay, D. y Kwon, B. 2011. 4-1BB signaling beyond T cells. *Cell Mol Immunol*. 8, 281–4.
 - Vinuesa, C., Tangye, S., Moser, B., Mackay, C. 2005. Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 5, 853–865.
 - Walsh, E. y Hruska, J. 1983. Monoclonal Antibodies to Respiratory Syncytial Virus Proteins: Identification of the Fusion Protein. *J Virol*. 171-177.
 - Wang, S., Rosenberger, C., Bao, Y. 2003. Clara cell secretory protein modulates lung inflammatory and immune responses to respiratory syncytial virus infection. *J Immunol*. 171, 1051–1060.
 - Wang, Y., Liu, C., Storey, J., Tibshirani, R., Herschlag, D., Brown, P. 2004. Precision and functional specificity in mRNA decay. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. 99, 5860-5865.
 - Watts T. 2005. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Ann Rev Immunol*. 23, 23–68.
 - Webster, P. 2002. Early Intracellular Events During Internalization of Listeria monocytogenes by J774 Cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 50(4): 503–517.
 - Welliver, R., Kaul, T., Putnam, T. 1980. The antibody response to primary and secondary infection with respiratory syncytial virus: kinetics of class-specific responses. *J Pediatr*. 96, 808–813.
 - West, M., Wallin, R., Matthews, S., Svensson, H., Zaru, R., Ljunggren, H. 2004. Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science*. 305, 1153–7.
 - Whiteside, T. 2001a. Isolation of human NK cells and generation of LAK activity. *Curr Protoc Immunol*. Chapter 7: Unit 7.7.
 - Whiteside, T. 2001b. Measurement of cytotoxic activity of NK/LAK cells. *Curr Protoc Immunol*. Chapter 7: Unit 7.18.
 - Wilcox, R., Chapoval, A., Gorski, K. 2002. Cutting edge: expression of functional CD137 receptor by dendritic cells. *J Immunol*. 168, 4262–7.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Winzler, C., Rovere, P., Rescigno, M., Granucci, F., Penna, G., Adorini, L. 1997. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med.* 185, 317–28.
 - Wong-Chew, R., Farfán, R., Sánchez, J., Nava, M., Casasola, J., Santos, J. 2010. Frecuencia de virus respiratorios y características clínicas de niños que acuden a un hospital en México. *Salud Pública de México.* 52(6), 528-532.
 - Xiang, P., Chen, T., Mou, Y., Wu, H., Xie, P., Lu, G., Gong, X., Hu, Q., Zhang, Y., Ji, H. 2015. NZ suppresses TLR4/NF-κB signalings and NLRP3 inflammasome activation in LPS-induced RAW264.7 macrophages. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society*, 64(10), 799–808.
 - Xie, Y., Akpinarli, A., Maris, C. 2010. Naive tumor-specific CD4(+) T cells differentiated in vivo eradicate established melanoma. *J Exp Med.* 207, 651–667.
 - Yang, J., Park, O., Lee, Y., Jung, H., Woo, K., Choi Y. 2008. The 4-1BB ligand and 4-1BB expressed on osteoclast precursors enhance RANKL-induced osteoclastogenesis via bi-directional signaling. *Er J Immunol.* 38, 1598–609.
 - Yin, C., Muhammad, J., Anfernee Kai-Wing, T., Su, T., Fu, X., Li, T., Guo, H., Zhu, P., Li, J., Chou, J., Wang, Y., Yu, Z. 2019. Young Yum pill inhibits inflammatory mediators and nuclear factor-kappa B signaling in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Journal of traditional Chinese medicine*, 39(5), 624–631.
 - Yui, I., Hoshi, A., Shigeta, Y., Takami, T., Nakayama, T. 2003. Detection of human respiratory syncytial virus sequences in peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol.* 70, 481–489.
 - Zapata, J., Krajewska, M., Krajewski, S., Kitada, S., Welsh, K., Monks, A. 2000. TNFR-associated factor family protein expression in normal tissues and lymphoid malignancies. *J Immunol.* 165:5084–96.
 - Zapata, J., Perez, G., Carr, P., Martinez, I., Azpilikueta, A., Otano, I., Melero, I. 2018. CD137 (4-1BB) Signalosome: Complexity Is a Matter of TRAFs. *Front Immunol.* 15;9:2618.
 - Zeidler, P., Millecchia, L., Castranova, V. 2004. Role of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in lipopolysaccharide plus interferon-gamma-induced pulmonary inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 195, 45–54.
 - Zhang, J., Liang, Y., Lin, Y., Liu, Y., YouYou, Yin, W. 2016. IRE1α-TRAF2-ASK1 pathway is involved in CSTMP-induced apoptosis and ER stress in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Biomedicine & pharmacotherapy.* 82, 281–289.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Zhang, S., Kaplan, M. 2000. The p38 mitogen-activated protein kinase is required for IL-12-induced IFN-gamma expression. *Journal of Immunology*. (Baltimore, Md. : 1950), 165(3), 1374–1380.
 - Zhao, P., Gao, D., Wang, Q., Song, B., Shao, Q., Sun, J. 2014. Response gene to complement 32 (RGC-32) expression on M2-polarized and tumor-associated macrophages is M-CSF-dependent and enhanced by tumor-derived IL-4. *Cell Mol Immunol*. 692–699.
 - Zhao, W., Liu, L., Du, G., Liu, S. 2018. A multifunctional tag with the ability to benefit the expression, purification, thermostability and activity of recombinant proteins. *Journal of biotechnology*, 283, 1–10.
 - Zheng, C., Kabaleeswaran, V., Wang, Y., Cheng, G., Wu, H. 2010. Crystal structures of the TRAF2: cIAP2 and the TRAF1: TRAF2: cIAP2 complexes: affinity, specificity, and regulation. *Molecular cell*. 38(1), 101–113.
 - Zhou F. 2009. Molecular mechanisms of IFN-gamma to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation. *International reviews of immunology*, 28(3-4), 239–260.
 - Zhou, B., Li, C., Yang, Y., Wang, Z. 2020. RIG-I Promotes Cell Death in Hepatocellular Carcinoma by Inducing M1 Polarization of Perineal Macrophages Through the RIG-I/MAVS/NF-κB Pathway. *OncoTargets and therapy*, 13, 8783–8794.
 - Zur Lage, S., Goethe, R., Darji, A., Valentin-Weigand, P., Weiss, S. 2003. Activation of macrophages and interference with CD4+ T-cell stimulation by Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and Mycobacterium avium subspecies avium. *Immunology*. 08, 62–9.

ANEXOS

Estandarización de anticuerpos de la vía de señalización

Para poder valorar la expresión de las diferentes proteínas de señalización del señalosoma 4-1BB/4-1BBL se realizaron extracciones de proteína total de diferentes líneas celulares (Tabla 3) para identificar controles positivos con el mismo procedimiento del apartado 5.4-1.

Tabla 3. Descripción de líneas celulares utilizadas para controles de proteínas de señalización.

Línea celular	Características	Cantidad de células
A539	Línea celular de carcinoma alveolar inmortalizadas (ATCC® CCL-185™), cultivadas en medio DMEM F-12 suplementado. (Lieber y col., 1976).	2,000,000 células
U937	Línea celular de monocitos humanos inmortalizados (ATCC® CRL-1593.2™), cultivados en medio DMEM suplementado. (Ralph y col., 1976).	5,000,000 células

20 µg de la proteína extraída total de cada línea celular se corrió en un gel de acrilamida al 13.5% en las mismas condiciones que en apartado 5.1-5. Para identificar las proteínas de señalización se utilizaron los anticuerpos TRAF2 con dilución 1:500 y p38 α/β con dilución 1:500.

Antes de analizar el efecto biológico de la proteína recombinante sobre células RAW 264.7, se procedió a la estandarización de las diluciones óptimas de los anticuerpos utilizando extractos proteicos totales de la línea celular A594, las cuales son células de carcinoma alveolar inmortalizadas y en las células U937, que son monocitos humanos inmortalizados. Las proteínas TRAF2 se encuentran presentes de manera constitutiva en estas dos líneas celulares. En el caso de la proteína p38, también se encuentra de forma constitutiva en su forma no activada (defosforilada) (Haas y col., 2009; Zhang y col., 2016).

En la figura 31 se observa que se detectaron bandas proteicas a 55 kDa usando anticuerpo anti-TRAF2 diluido 1:500, las cuales son correspondientes aproximadamente al peso

molecular de la proteína que es de 50 kDa (Diessenbacher y col., 2008). Estas bandas se pueden ver en el carril en el que se separaron las proteínas de la línea celular A594 y U937, presentando bandas de mayor intensidad (Ralph y col., 1976). En el caso de RAW 264.7 si se observó una banda menos pronunciada (Fig. 31A). La proteína p38 α/β presentó bandas bien marcadas a 38 kDa (Haas y col., 2009), correspondientes al peso molecular de esta proteína de señalización. En este caso, se observó tanto en los carriles de RAW 264.7 con o sin estímulo de LPS 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 31B).

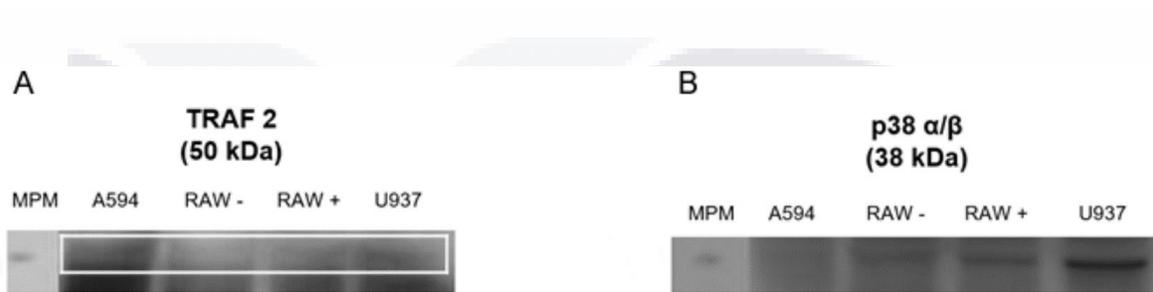


Figura 31. Western blot de controles de la vía de señalización. MPM: Marcador de peso molecular. A) western blot de la proteína TRAF2, muestra bandas a los 52 kDa de la extracción total de proteína de la línea celular A594, RAW 264.7 (RAW -), RAW 264.7 estimulada con LPS 0.5 μg (RAW +) y la línea celular U937. B) western blot de la proteína p38 α/β , muestra bandas a los 38 kDa de la extracción total de proteína de la línea celular A594, RAW 264.7 (RAW-), RAW 264.7 estimulada con LPS 0.5 μg (RAW+) y la línea celular U937.