



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Efecto de péptidos derivados de la proteína gp85 del virus de Epstein- Barr sobre la expresión de citoquinas en células mononucleares de sangre periférica**

**Jenny Alejandra Botero Buitrago**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Química  
Bogotá, D.C., Colombia

2023

# **Efecto de péptidos derivados de la proteína gp85 del virus de Epstein-Barr sobre la expresión de citoquinas en células mononucleares de sangre periférica**

**Jenny Alejandra Botero Buitrago**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias – Bioquímica**

Director:

Mauricio Urquiza Martínez

Ph.D., Doctor en Ciencias-Química,

Línea de Investigación:

Bioactividad

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Hormonas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, D.C., Colombia

2023

*A mis padres, mi novio, y a todos quienes me  
brindaron su apoyo y comprensión a lo largo  
de este camino.*

*“Somewhere, something incredible is waiting  
to be known”.*

*Carl Sagan*

## **Declaración de obra original**

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

---

Nombre: Jenny Alejandra Botero Buitrago

Fecha 31/01/2023

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional de Colombia, a la Facultad de Ciencias y en especial al programa de Maestría en Ciencias – Bioquímica, por permitir el desarrollo de mis estudios y complementar mi formación académica.

A mi director, el profesor Mauricio Urquiza Martínez, por su paciencia y colaboración para el desarrollo de este trabajo.

A la profesora Adriana Umaña Pérez, por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, por su tiempo, orientación y dedicación durante este proceso, y por su apoyo profesional y personal.

Al Grupo de Investigación en Hormonas (GIH), en donde fue posible desarrollar mis habilidades científicas y en donde conocí personas con muchas capacidades, dispuestas a compartir su conocimiento y su tiempo para apoyar la culminación de este proyecto. En especial a Erika Díaz y Carolina Cuevas, por enseñarme el valor de la resiliencia.

Al grupo de investigación de Inmunología y Medicina Traslacional de la Facultad de Medicina, y a sus integrantes, por su colaboración y buena disposición para llevar a cabo los ensayos de citometría de flujo.

A todos aquellos quienes con sus enseñanzas y su apoyo contribuyeron con el desarrollo de este proyecto.

VI Efecto de péptidos derivados de la proteína gp85 del virus de Epstein-Barr sobre la expresión de citoquinas en células mononucleares de sangre periférica

---

## Resumen

### **Efecto de péptidos derivados de la proteína gp85 del virus de Epstein-Barr sobre la expresión de citoquinas en células mononucleares de sangre periférica**

Las citoquinas son proteínas involucradas principalmente en la comunicación intercelular durante la respuesta inmune. Algunas citoquinas pueden inhibir el desarrollo y progresión de tumores, y estos efectos parecen estar relacionados con la modulación de la respuesta antitumoral. Estudios previos han identificado moléculas capaces de regular su expresión, entre ellas, un péptido derivado del sitio de unión de la glicoproteína gp85 del virus de Epstein-Barr a leucocitos humanos, denominado 11438. En este trabajo, se evaluó el efecto de este péptido y su análogo (33210) sobre la producción de citoquinas pro y antiinflamatorias, a nivel de ARNm y de proteína, en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) sanas, así como la inducción de cambios fenotípicos en esta población celular. Se determinó que los péptidos inducen un aumento en la expresión génica de citoquinas como IL-12B e IL-4, y que el péptido 33210 modificó el perfil de expresión de citoquinas a nivel de proteína al aumentar la producción de citoquinas inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-6. Con relación a los marcadores de superficie de linfocitos y monocitos específicamente, se estableció una tendencia que indica que los péptidos modifican su expresión, indicando una regulación continua de la respuesta inmune. Estos resultados sugieren que los péptidos evaluados pueden actuar como moléculas promisorias para ayudar a la erradicación de células tumorales, en tanto inducen una activación de la respuesta inmune mediada por la expresión de citoquinas pro y antiinflamatorias.

**Palabras clave:** Citoquinas, péptidos, perfil de expresión, inflamación, regulación.

## **Abstract**

### **Effect of peptides derived from the gp85 protein of the Epstein-Barr virus on cytokine expression in peripheral blood mononuclear cells**

Cytokines are proteins mainly involved in intercellular communication during the immune response. Some cytokines can inhibit the development and progression of tumors, and these effects seem to be related to the modulation of the antitumor response. Previous studies have identified molecules capable of regulating its expression, among them, a peptide derived from the binding site of the glycoprotein gp85 of the Epstein-Barr virus to human leukocytes, called 11438. In this work, the effect of this peptide was evaluated and its analogue (33210) on the production of pro- and anti-inflammatory cytokines, at the mRNA and protein level, in healthy peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), as well as the induction of phenotypic changes in this cell population. It was determined that the peptides induce an increase in the gene expression of cytokines such as IL-12B and IL-4, and that peptide 33210 modified the cytokine expression profile at the protein level by increasing the production of inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-8 and IL-6. Regarding the surface markers of lymphocytes and monocytes specifically, a trend was established indicating that the peptides modify their expression, indicating a continuous regulation of the immune response. These results suggest that the peptides evaluated may act as promising molecules to help eradicate tumor cells, while inducing an activation of the immune response mediated by the expression of pro- and anti-inflammatory cytokines.

**Keywords: Cytokines, peptides, expression profile, inflammation, regulation.**

# Contenido

	Pág.
<b>1. Marco teórico.....</b>	<b>3</b>
1.1 Virus de Epstein-Barr .....	3
1.2 Glicoproteína gp85 del virus de Epstein-Barr .....	5
1.2.1 Péptidos derivados de gp85 .....	6
1.3 Generalidades de la respuesta inmune .....	8
1.4 Citoquinas .....	9
1.4.1 Citoquinas proinflamatorias .....	12
1.4.2 Citoquinas antiinflamatorias .....	13
1.4.3 Tormenta de citoquinas .....	14
1.4.4 Papel de las citoquinas en inmunoterapia .....	15
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>18</b>
2.1 Objetivo general .....	18
2.2 Objetivos específicos .....	18
<b>3. Materiales y métodos .....</b>	<b>19</b>
3.1 Modelos biológicos.....	19
3.1.1 Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMCs) .....	19
3.1.2 Línea celular derivada de monocitos.....	20
3.2 Tratamientos .....	20
3.3 Ensayo de unión del péptido 11438 .....	21
3.3.1 Ensayo de unión por citometría de flujo .....	21
3.3.2 Ensayo de unión por microscopía de fluorescencia .....	22
3.4 Análisis del potencial de membrana mitocondrial ( $\Psi\Delta m$ ) de PBMCs.....	22
3.5 Análisis de la expresión génica de citoquinas.....	23
3.5.1 Extracción de ARN .....	23
3.5.2 Transcripción reversa (RT-PCR).....	23
3.5.3 Optimización de primers (cebadores) .....	24
3.5.4 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativo (qPCR) ....	24
3.6 Análisis de la expresión proteica de citoquinas .....	25
3.6.1 Determinación de citoquinas pro y antiinflamatorias .....	25
3.7 Evaluación de cambios en el fenotipo por efecto de los péptidos en PBMCs ...	26
3.7.1 Ensayo de proliferación de linfocitos.....	26
3.7.2 Evaluación de cambios en el fenotipo de linfocitos .....	26
3.7.3 Evaluación de cambios en el fenotipo de monocitos .....	27
3.8 Análisis estadístico.....	28

<b>4. Resultados y discusión .....</b>	<b>29</b>
4.1 Ensayo de unión del péptido 11438 a leucocitos humanos .....	29
4.2 Análisis del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) .....	33
4.3 Análisis de la expresión génica de citoquinas.....	38
4.4 Análisis de la expresión proteica de citoquinas .....	43
4.5 Evaluación de cambios en el fenotipo por efecto de los péptidos en PBMCs ...	48
4.5.1 Evaluación de cambios en el fenotipo de linfocitos .....	48
4.5.2 Evaluación de cambios en el fenotipo de monocitos .....	53
<b>5. Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>58</b>
5.1 Conclusiones.....	58
5.2 Recomendaciones.....	59
<b>A. Anexo: Cromatograma péptidos 11438 y 33210.....</b>	<b>61</b>
<b>B. Anexo: Condiciones de trabajo para la determinación de la expresión génica de citoquinas por qPCR .....</b>	<b>62</b>
<b>C. Anexo: Expresión génica de GM-CSF e IL-10 en la línea celular U-937.....</b>	<b>64</b>
<b>D. Anexo: Curvas de calibración CBA.....</b>	<b>65</b>
<b>E. Anexo: Certificados de presentación en eventos académicos .....</b>	<b>66</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>67</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1-1</b> Propuesta del mecanismo de entrada del VEB a linfocitos B, células epiteliales y monocitos. ....	5
<b>Figura 1-2</b> Comunicación intercelular mediada por citoquinas. ....	10
<b>Figura 4-1</b> Representación de la unión total del péptido 11438 a PBMCs totales. ....	30
<b>Figura 4-2</b> Representación de la curva de unión del péptido en diferentes poblaciones celulares. ....	31
<b>Figura 4-3</b> Microscopía de fluorescencia representativa de la unión del péptido 11438 en PBMCs y en la línea celular U-937. ....	32
<b>Figura 4-4</b> Cambio en el porcentaje de expresión de DiOC <sub>6</sub> (3). ....	34
<b>Figura 4-5</b> Evaluación de la actividad citotóxica de los péptidos 11438 y 33210. ....	36
<b>Figura 4-6</b> Cambios conjuntos en la expresión génica de citoquinas pro y antiinflamatorias en PBMCs ....	39
<b>Figura 4-7</b> Cambios en la expresión génica de citoquinas pro y antiinflamatorias en PBMCs por efecto del péptido 11438. ....	40
<b>Figura 4-8</b> Cambios en la expresión génica de citoquinas pro y antiinflamatorias en PBMCs por efecto del péptido 33210 ....	41
<b>Figura 4-9</b> Cambios en el perfil de expresión proteica de citoquinas pro y antiinflamatorias secretadas en PBMCs ....	44
<b>Figura 4-10</b> Expresión de citoquinas inflamatorias a nivel de proteína. ....	48
<b>Figura 4-11</b> Índice de proliferación por efecto de los péptidos 33210 y 11438. ....	49
<b>Figura 4-12</b> Efecto de los péptidos 33210 y 11438 en el perfil de linfocitos ....	53
<b>Figura 4-13</b> Microfotografías representativas de la obtención de células dendríticas. ....	54
<b>Figura 4-14</b> Efecto del péptido 11438 sobre monocitos aislados de PBMCs ....	56

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1-1</b> Análogos derivados del péptido 11438.....	7
<b>Tabla 3-1</b> Secuencia de los péptidos utilizados.....	21
<b>Tabla A-1</b> Condiciones de amplificación para los genes de citoquinas. ....	62

## Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término	
<b>AP-1</b>	Proteína activadora 1	Activator protein 1
<b>APC</b>	Célula presentadora de antígeno	Antigen-presenting cell
<b>ARNm</b>	ARN mensajero	
<b>CD</b>	Clúster de diferenciación	Cluster of differentiation
<b>CR2</b>	Receptor de complemento tipo 2	
<b>CRS</b>	Síndrome de liberación de citoquinas	Cytokine release syndrome
<b>DCs</b>	Células dendríticas	Dendritic cells
<b>EphA2</b>	Receptor de efrina A2	EPH Receptor A2
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma	
<b>IL-X</b>	Interleuquina X	
<b>IL-1RI</b>	Receptor de señalización de IL-1 tipo I	Signaling IL-1 receptor type I
<b>IL-1RA</b>	Antagonista del receptor de IL-1	Interleukin-1 receptor antagonist
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
<b>HBSS</b>	Solución balanceada de Hank	Hank's balanced salt solution
<b>HLA</b>	Antígenos leucocitarios humanos	Human leukocyte antigens
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido	
<b>MCLC</b>	Línea celular de tipo monocito	Monocyte-like cell line
<b>MFI</b>	Intensidad Media de Fluorescencia	Mean Fluorescent Intensity
<b>MHC</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad	Major Histocompatibility Complex
<b>MoDCs</b>	Células dendríticas derivadas de monocitos	Monocyte-derived dendritic cells
<b>NF-<math>\kappa\beta</math></b>	Factor nuclear Kappa $\beta$	Nuclear factor Kappa $\beta$
<b>NK</b>	Células citolíticas naturales	Natural Killer cells
<b>PBMCs</b>	Células mononucleares de sangre periférica	Peripheral blood mononuclear cells

XIV Efecto de péptidos derivados de la proteína gp85 del virus de Epstein-Barr sobre la expresión de citoquinas en células mononucleares de sangre periférica

---

<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa	Polymerase chain reaction
<b>PE</b>	Ficoeritrina	Phycoerythrin
<b>PPRs</b>	Receptores de reconocimiento de patrones	Pattern-recognition receptors
<b>PAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos	Pathogen-associated molecular patterns
<b>PHA</b>	Fitohemaglutinina	Phytohemagglutinin
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino	
<b>TCR</b>	Receptor de células T	T-cell receptor
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
<b>Th0</b>	Linfocitos T vírgenes	
<b>Th1</b>	Linfocitos T cooperadores tipo 1	
<b>Th2</b>	Linfocitos T cooperadores tipo 2	
<b>Th17</b>	Linfocitos T cooperadores tipo 17	
<b>Thf</b>	Linfocitos T cooperadores foliculares	
<b>Treg</b>	Linfocitos T reguladores	
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa	Tumor necrosis factor alpha
<b>VEB</b>	Virus de Epstein-Barr	

# Introducción

Las citoquinas son proteínas moduladoras del sistema inmune, que juegan un papel fundamental en la señalización celular y regulan el proceso inflamatorio generado por la presencia de agentes extraños en el organismo. Bajo condiciones normales, una respuesta inflamatoria se regula por mecanismos activos. Un desequilibrio entre los mecanismos pro y antiinflamatorios genera la activación crónica de células inmunes y de la inflamación, lo que ocurre comúnmente, por ejemplo, en pacientes con cáncer en donde el microambiente del tumor es rico en citoquinas, lo que a su vez influye en la inmunosupresión, el crecimiento de células cancerígenas y angiogénesis (1).

Uno de los acercamientos recientes diseñados para la erradicación del cáncer es la producción de respuestas inmunitarias específicas provocadas a partir de la reacción del sistema inmune innato y adaptativo frente a los tumores. Sin embargo, algunos de los tratamientos utilizados en la inmunoterapia en cáncer no son sensibles y su acción, aunque es potente contra células tumorales, presenta una alta toxicidad para las células sanas. En los últimos años se ha establecido el uso de citoquinas en inmunoterapia para el tratamiento de esta enfermedad ya que juegan un papel importante en la respuesta inmune frente a tumores (2).

No obstante, modular la respuesta generada por la producción de citoquinas no solo tiene implicaciones a nivel de terapias contra el cáncer, sino que también está relacionada con el tratamiento frente a enfermedades infecciosas, autoinmunes y alergias.

Una posible solución a la problemática de la baja especificidad en los tratamientos es identificar moléculas que puedan controlar dicha respuesta y ser utilizadas como terapia coadyuvante. Los *Herpesvirus* como el VEB son muy eficientes en modular la respuesta inmune en muchos casos a través de las proteínas que expresan; de hecho se han encontrado regiones que son capaces de generar este tipo de actividad biológica. Entre

estas, se encuentran péptidos promisorios, y en particular, un fragmento derivado del sitio de unión la proteína gp85 del VEB a leucocitos humanos, identificado como 11438, el cual, de acuerdo con la evidencia preliminar, se une a linfocitos B e induce cambios fenotípicos en leucocitos de sangre periférica, lo que está mediado por la producción de un perfil de citoquinas específico. Sin embargo, se desconoce cómo está conformado dicho perfil o cómo es su cinética de activación, por lo que se hace necesario establecer el efecto provocado por este péptido en la regulación de la respuesta inmune, así como el papel que tendría un análogo derivado de este en la producción de citoquinas pro y antiinflamatorias.

Teniendo en cuenta lo anterior, este estudio buscó indagar en el efecto de este péptido en la conformación de un perfil de expresión de citoquinas en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de individuos sanos, tanto a nivel génico como a nivel de proteína, y además, determinar la producción de cambios de fenotipo en poblaciones celulares definidas.

De manera general, este estudio permitió identificar la aparición de una regulación mixta de citoquinas, con base en el aumento en la expresión génica de IL-4 e IL-12B, así como en la producción de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-8, lo que permitiría relacionar dicha expresión con los efectos sobre el cambio de fenotipo en el modelo celular evaluado, contribuyendo así con las investigaciones emergentes en la modulación de la respuesta inmune para el tratamiento de diversas enfermedades.

# 1. Marco teórico

## 1.1 Virus de Epstein-Barr

El virus de Epstein-Barr (VEB) es uno de los virus más comunes y persistentes en los seres humanos, con una prevalencia de infección latente en aproximadamente el 95% de la población mundial (3). Está implicado en el desarrollo de enfermedades como mononucleosis infecciosa en adolescentes y síndromes linfoproliferativos en pacientes con un sistema inmune comprometido. Está asociado también con una variedad de tumores malignos como el linfoma de Burkitt, el linfoma de Hodgkin y carcinoma nasofaríngeo (4–6). El virus está envuelto por una membrana que contiene entre otras, estas proteínas específicas del virus: gp350, gp220, p140 y gp85, las cuales también están presentes en las membranas de las células infectadas. Los linfocitos B y las células epiteliales son los principales blancos del VEB (4,7,8).

El VEB pertenece a la familia de los herpesvirus (*Herpesviridae*), la cual codifica un complejo de dos glicoproteínas, gH y gL, necesarias para la penetración del virus. La glicoproteína gH requiere de la asociación con gL para su correcto plegamiento y transporte en las células infectadas (9). Las proteínas homólogas a gH y gL en el VEB corresponden a gp85 y gp25, respectivamente, las cuales presentan una región de homología en los marcos abiertos de lectura BXLF2 y BKRF2 del virus (10,11). El complejo gH/gL incluye también una tercera glicoproteína, gp42, la cual es producto del marco abierto de lectura BZLF2, y es esencial en la interacción con linfocitos B (9,11).

La infección por el VEB en linfocitos B ocurre principalmente a través del complejo proteico gp350/220, que se une con alta afinidad al receptor de complemento tipo 2 (CR2), también denominado CD21, lo que resulta en la fijación del virus (9), así como por el complejo

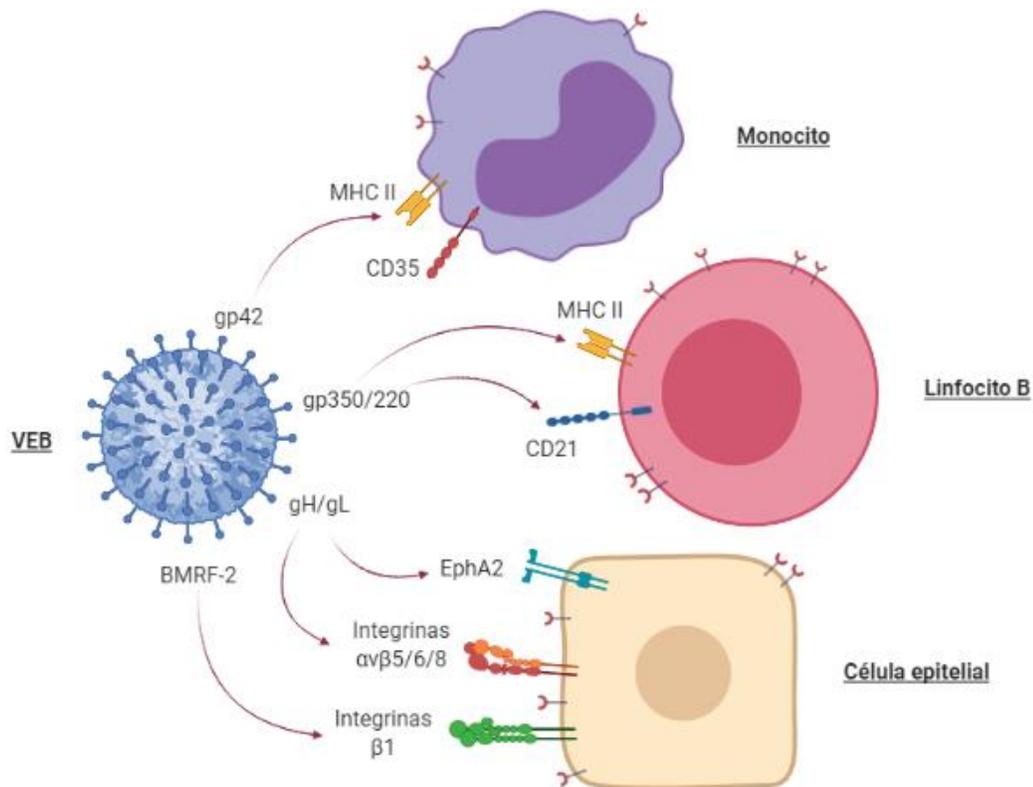
#### 4 Efecto de péptidos derivados de la proteína gp85 del virus de Epstein-Barr sobre la expresión de citoquinas en células mononucleares de sangre periférica

---

gp85/gp25/gp42 y gB, que median la unión al dominio  $\beta 1$  de la proteína HLA-DR clase II a través de gp42, para activar la fusión del virus (11).

En células epiteliales, ocurre una interacción directa entre el complejo gH/gL con las integrinas  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 6$  y  $\alpha\beta 8$  (12,13), a través del motivo de unión a integrina KGD, induciendo un posible cambio conformacional del complejo, facilitando la unión de la glicoproteína gB (gp110) y la fusión del virus a la célula (14,15), aunque recientemente se ha demostrado que estas integrinas no son los receptores primarios para la entrada del virus, y que su internalización y fusión está mediada por el dominio extracelular del receptor de efrina-A2 (EphA2) (16,17). Adicionalmente, se ha establecido que el VEB puede utilizar la proteína BMRF-2 para unirse a células epiteliales polarizadas mediante las integrinas  $\alpha\beta 1$ , gracias al motivo de unión a integrina RGD, presente en esta proteína (18,19).

Se ha reportado que el VEB también puede infectar monocitos, los cuales pueden tener un papel fundamental en la infección primaria o reactivación del virus (20,21), así como en la propagación del virus de linfocitos B a células epiteliales (8). Sin embargo, el mecanismo de infección no es claro todavía, ya que los monocitos no expresan CD21, el cual es el receptor principal para el VEB en otras células. No obstante, se ha demostrado que la infección por el virus puede ocurrir vía CD35 y HLA-DR en células deficientes en CD21 (22,23). Y particularmente, se ha identificado que la molécula HLA-DR es importante en el proceso de infección viral en monocitos, así como lo es en otros tipos celulares como células dendríticas plasmocitoides y linfocitos B, en donde actúa como receptor o correceptor para el VEB, respectivamente (24) (Figura 1-1).



**Figura 1-1** Propuesta del mecanismo de entrada del VEB a linfocitos B, células epiteliales y monocitos.

## 1.2 Glicoproteína gp85 del virus de Epstein-Barr

La glicoproteína gp85, conocida como proteína VEB-gH, tiene un papel fundamental en el proceso de fusión a membrana entre el virus y los linfocitos humanos durante la infección. Se ha demostrado que cuando el complejo de gp85 está ausente, el virus no puede fusionarse a la membrana celular de linfocitos B, aunque su unión no se ve afectada; y tampoco puede unirse a las células epiteliales (14), indicando que esta proteína es necesaria para la infección mediada por el virus en las células blanco (18,25).

Existen dos tipos de complejos proteicos asociados con gp85: el complejo heterotrimérico gH/gL/gp42 (gp85/gp25/gp42) y el heterodímero gH/gL, que favorecen la penetración del virus en linfocitos B y en células epiteliales, respectivamente es decir la presencia del complejo dicta en gran medida el tropismo celular. El primero de estos se encuentra

altamente expresado en el VEB producido en células epiteliales, mientras que el segundo se expresa preferencialmente en el VEB producido en linfocitos B (9). La modulación de la proporción dímero: trímero es importante para definir el tropismo celular del VEB. El cambio de este se produce por el ambiente celular en el que el virus se replica y por las proteínas presentes en su membrana. En linfocitos B, los niveles del heterotr trímero disponibles para la incorporación en el virión son reducidos debido a la interacción con las moléculas de HLA clase II, mientras que en las células epiteliales sus niveles aumentan (19,26). De este modo, el virus derivado de linfocitos B tiende a infectar fácilmente células epiteliales, mientras que aquel derivado de células epiteliales tiende a infectar con mayor facilidad a los linfocitos B (8,9,13).

Se ha reportado que el complejo gH/gL se une también a monocitos y a células dendríticas, las cuales son susceptibles de sufrir apoptosis si la infección se da en estados tempranos de su diferenciación (27). Al cultivar monocitos en presencia de GM-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos) e IL-4 (Interleuquina 4) simultáneamente con el VEB, se produce la inhibición del desarrollo de células dendríticas derivadas de monocitos (MoDCs), manifestada por la expresión constante del marcador de superficie CD14, dada por la interacción de gH con la superficie de los monocitos (27,28).

### 1.2.1 Péptidos derivados de gp85

El gen para gp85 en el marco abierto de lectura BXL2F2 codifica para una proteína conformada por 706 aminoácidos (4). Se han identificado previamente secuencias específicas de péptidos de unión a células epiteliales y a linfocitos B derivados de esta proteína, involucrados en la interacción virus – célula huésped. Entre estos, se encuentran los péptidos denominados 11431 (<sup>121</sup>MLSAPLEKQLFYIGTMLPN<sup>140</sup>), 11435 (<sup>181</sup>TYKRVTEKGDEHVLVSLVFGK<sup>200</sup>), 11436 (<sup>201</sup>TKDLPDLRGPFSYPSL TSAQ<sup>220</sup>), 11438 (<sup>241</sup>YFVPNLKMFSRAVTMTAAS<sup>260</sup>) y 11446 (<sup>401</sup>LSAYNRHPLFQPLHTVMRET<sup>420</sup>). Estudios indican que estos se unen con alta afinidad a líneas celulares derivadas de linfoma como Raji, Ramos y P3HR-1, pero no a eritrocitos, lo que indica que las secuencias muestran un comportamiento de unión a células similar al VEB, por lo que pueden ser usados para diseñar estrategias contra la infección por el virus (14).

Se ha determinado que la glicoproteína gp85 media la unión del virus a MoDCs a través de los péptidos 11435 y 11438, los cuales inducen efectos como apoptosis y la expresión de citoquinas como IL-10, IL-6 e IL-12, que estimulan e inhiben la activación de linfocitos Th1 CD4+ (29,30).

Estas secuencias (11435 y 11438) son las regiones específicas de unión a las células huésped e inhiben la invasión del virus en linfocitos de sangre periférica (14). Ensayos con el péptido 11438 han permitido determinar si la actividad biológica de los péptidos puede aumentar al hacer modificaciones en la secuencia de aminoácidos, y de este modo estabilizar su estructura helicoidal (30).

En estudios previos se estableció que el contenido helicoidal del péptido 11438 era muy bajo, debido en parte a la presencia de <sup>4</sup>P y por las ramificaciones beta de los residuos <sup>14</sup>V<sup>17</sup>TMT<sup>17</sup> que podrían provocar una distorsión en la  $\alpha$ -hélice en el extremo C-terminal y N-terminal, respectivamente. Es por esto por lo que tres grupos de análogos fueron diseñados para realizar los ensayos de actividad biológica, utilizando la secuencia <sup>5</sup>NLKDMFSRA<sup>13</sup> como plantilla para el diseño de los péptidos. Se modificó la secuencia al adicionar aminoácidos en el extremo C-terminal (Grupo 1), en el extremo C-terminal luego de <sup>13</sup>Ala (Grupo 2) o en el extremo N-terminal antes de <sup>5</sup>Asn (Grupo 3), para determinar la estructura de  $\alpha$ -hélice más estable. Estos análogos corresponden a los péptidos denominados 33207, 33208 y 33210 (30) (Tabla 1-1).

**Tabla 1-1** Análogos derivados del péptido 11438 (30),

Código del péptido	Secuencia
11438	YFVP <b>NLKDMFSRA</b> VTMTAAS
33207	<b>NLKDMFSRA</b> VTMTAASRKRAE
33208	MEDDY <b>NLKDMFSRA</b> VTM
33210	FVF <b>NLKDMFSRA</b> NRKRKA

El análisis estructural de los péptidos mostró que los análogos presentaban una estructura más estable con respecto al péptido 11438, y que, de forma similar a este, inhiben la

invasión viral de las células huésped en PBMCs en una concentración de 27  $\mu\text{M}$ . Dado que la proteína gH también se une a células epiteliales, se evaluó su actividad, encontrando que hay inhibición de la invasión en concentraciones de 7, 13 y 27  $\mu\text{M}$  (30). Además, se determinó que uno de los análogos (33210) tiene una mayor actividad de unión en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y en células Raji con respecto al péptido 11438, y en particular se une de forma preferencial a linfocitos T (CD3+), en comparación con linfocitos B (CD19) o monocitos (CD14); también induce apoptosis en monocitos pero no en linfocitos T a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , y adicionalmente, induce la producción de IL-12p70 en monocitos cultivados con GM-CSF e IL-4 e inhibe su desarrollo hacia células dendríticas (28,30).

Lo anterior indica que es posible modular la actividad biológica del péptido 11438 modificando parcialmente su secuencia de aminoácidos y que el diseño de análogos es útil para entender mejor el mecanismo de interacción entre estos péptidos y las células del sistema inmune.

### **1.3 Generalidades de la respuesta inmune**

La respuesta inmune está relacionada con la respuesta conjunta y coordinada de las células y moléculas del sistema inmunitario frente a la introducción de sustancias extrañas en el organismo y está mediada por la inmunidad innata y adaptativa, y aunque cada una presenta diferentes mecanismos de acción, las dos son necesarias para alcanzar una respuesta inmune completamente efectiva (31).

La inmunidad innata corresponde a la primera barrera de defensa del organismo e incluye mecanismos celulares y bioquímicos que existen desde el nacimiento del individuo y que reaccionan de forma inespecífica frente a agentes externos respondiendo de forma inmediata a la infección (32). Su componente celular incluye células fagocíticas como neutrófilos y macrófagos, células dendríticas, mastocitos y linfocitos citolíticos naturales (*NK*, por sus siglas en inglés), los cuales median las respuestas inflamatorias a la infección ya que expresan una amplia variedad de receptores de reconocimiento de patógenos (31,33).

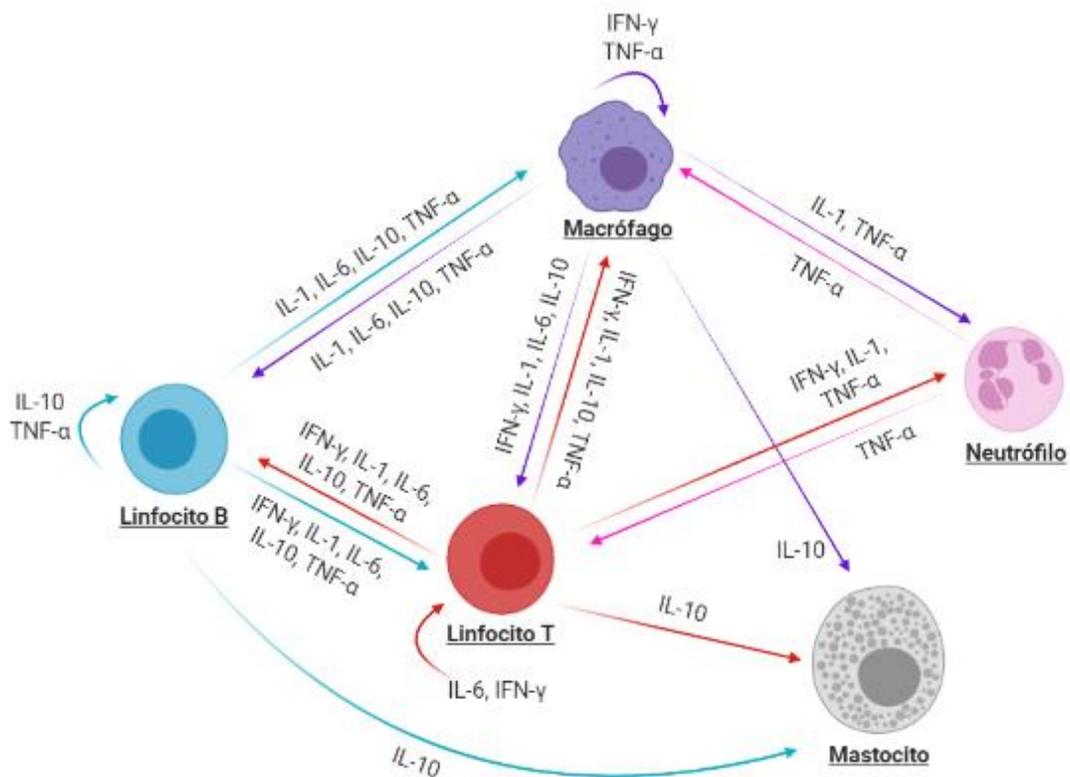
Estas células permiten desarrollar una interacción entre la inmunidad innata y la activación de la inmunidad adaptativa. Esta última surge como respuesta a la infección y se adapta a ella, reconociendo una gran cantidad de sustancias extrañas. Se caracteriza por poseer especificidad y memoria (32,34), en tanto que distingue diferentes sustancias y responde con mayor magnitud a exposiciones repetidas del mismo agente extraño. Además, está compuesta por los linfocitos y células presentadoras de antígeno, y todos los productos de secreción derivados de ellos, como anticuerpos y citoquinas (31,32).

## 1.4 Citoquinas

La respuesta inflamatoria tiene un papel importante en los procesos de inmunidad innata y adaptativa del organismo, y ocurre como consecuencia de la exposición de tejidos y órganos a diversos estímulos perjudiciales. En esta intervienen células del sistema inmune como monocitos, macrófagos, neutrófilos, linfocitos T, linfocitos B, entre otras, y es controlada principalmente por moléculas reguladoras extracelulares como citoquinas y quimioquinas, quienes regulan el reclutamiento de estas células y los mecanismos de control de señalización intracelular (31).

Las citoquinas son un grupo heterogéneo de glicoproteínas solubles de bajo peso molecular, usualmente menor a 30 kDa, que presentan un efecto específico en las interacciones y la comunicación intercelular y se consideran un componente clave en la respuesta inmune (2). Actúan como mediadores y moduladores entre ambientes altamente localizados y regulan también el desarrollo hematopoyético (35). Son producidas principalmente por células inmunes como linfocitos Th y macrófagos, y en otras poblaciones celulares, como células endoteliales. Sus efectos pueden ser sistémicos: en células distantes (señalización endocrina) o locales y específicos para tejidos: en las células que las secretan (señalización autocrina) o en células cercanas (señalización paracrina). Además, su patrón de función biológica puede ser redundante, complementaria, pleiotrópica y en algunos casos, antagonista (36).

Interactúan entre sí en formas complejas que pueden ser aditivas, sinérgicas o que involucran la inducción de una citoquina por otra ya que generalmente se producen en cascada, en donde una citoquina estimula sus células blanco para producir citoquinas adicionales (Figura 1-2) (35,37).



**Figura 1-2** Comunicación intercelular mediada por citoquinas. (Adaptada de (35)). La comunicación a través del perfil de citoquinas tiene efectos variados en la respuesta inmune que oscilan entre activación e inactivación de la respuesta inmune.

La producción de citoquinas se genera durante la activación de la inmunidad innata y adaptativa. En la respuesta inmune innata, los macrófagos se activan y producen diversas citoquinas y receptores de citoquinas. Los macrófagos M1 estimulan la respuesta celular mediante la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-12, IL-26, TNF-α y altos niveles del receptor de señalización de IL-1 tipo I (IL-1RI), mientras que los macrófagos M2 estimulan la respuesta humoral mediante la producción de citoquinas

antiinflamatorias como IL-10 y TGF- $\beta$  (38). Por otro lado, en la respuesta inmune adaptativa, la producción de cascadas de citoquinas está dada principalmente por la diferenciación de linfocitos Th0 CD4+ a subtipos de linfocitos Th efectoros y linfocitos T reguladores (Treg), cuyas funciones están relacionadas con el tipo de citoquina que producen (1,38).

Las citoquinas están involucradas en el crecimiento, la activación y procesos anti o proinflamatorios en diferentes tipos celulares como linfocitos T, linfocitos B y macrófagos, así como en la maduración de células sanguíneas, promoviendo su diferenciación y proliferación. Están dirigidas a células que expresan receptores de alta afinidad en su membrana celular, los cuales luego de unirse a estas, actúan en la señalización intracelular provocando así modificaciones en la transcripción de genes o en funciones celulares particulares mediante la vía de señalización JAK-STAT, principalmente (2,39). Además, su papel es dependiente del contexto, lo que determina su función fisiológica normal. Sin embargo, la desregulación o una activación crónica de sus vías de señalización puede alterar la homeostasis del organismo provocando una inmunopatología asociada con diversas enfermedades (40).

Las citoquinas se pueden clasificar de acuerdo con su nomenclatura (41) en:

- **Interleuquinas:** Tienen un papel importante en el crecimiento, diferenciación y activación de células inmunes. Pueden ser pro o antiinflamatorias y generan una amplia variedad de respuestas.
- **Interferones:** Están involucrados en la regulación de la inmunidad innata frente a virus y otros patógenos microbianos. Se clasifican en tres tipos con base en la especificidad de sus receptores (tipos I, II y III). También inducen la activación de propiedades antivirales y de efectos anti-proliferativos o inmunomoduladores, por lo que se utilizan en el tratamiento de varias enfermedades.
- **Quimioquinas:** Es la familia más grande de citoquinas y sus miembros se clasifican en cuatro tipos dependiendo del espacio que hay entre sus dos primeros residuos de cisteína (CXC, CC, C y CX3C). Funcionan como quimioatrayentes para controlar la

migración de células y contribuyen a procesos como embriogénesis, desarrollo y función del sistema inmune innato y adaptativo, y en metástasis. La mayoría de las quimioquinas son proinflamatorias y se liberan en respuesta a infecciones, generando el reclutamiento de neutrófilos, monocitos, macrófagos y linfocitos al sitio de infección, siendo altamente selectivas para tipos celulares específicos.

- **Factores estimulantes de colonias (CSF):** Están relacionados con la estimulación de la proliferación y diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas, así como con la inflamación y hacen parte de una red de citoquinas proinflamatorias dependiente entre sí que puede generar una cascada de amplificación que perpetúa reacciones inflamatorias.
- **Factores de necrosis tumoral (TNF):** Tienen actividad proinflamatoria y un papel importante en enfermedades virales agudas. Se expresan en varios tipos celulares y presentan efectos pleiotrópicos por la gran cantidad de proteínas pertenecientes a esta familia. De manera general, activan linfocitos T citotóxicos y están asociados con varias enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes (41).

### 1.4.1 Citoquinas proinflamatorias

La inflamación es importante en el proceso de eliminación de patógenos y protección contra infecciones. Las citoquinas proinflamatorias definen la respuesta inmune de tipo 1 y son producidas por linfocitos Th1, macrófagos activados, linfocitos T CD4+ y células dendríticas, y están involucradas en el aumento de reacciones inflamatorias (37). Se ha demostrado ampliamente que algunas citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y TNF- $\alpha$  se relacionan con una gran diversidad de procesos patológicos (42–44). Estas citoquinas tienen un papel fundamental en la regulación del crecimiento celular, diferenciación y el desplazamiento de las células del sistema inmune a los distintos sitios de infección (45).

Las citoquinas proinflamatorias son reguladores de la respuesta del huésped a la infección, inflamación y trauma, pero en algunos casos esta respuesta puede generar condiciones

patológicas (46). Estas citoquinas pueden además inducir que otros tipos celulares, como células endoteliales, queratinocitos y fibroblastos también secreten citoquinas proinflamatorias y quimiocinas. Adicionalmente, pueden estimular la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales e inducir la retracción endotelial y la relajación del músculo liso vascular, facilitando la extravasación leucocitaria y el reclutamiento de células del sistema inmune innato, provocando la aparición de los signos de la inflamación aguda: rubor, edema, calor y dolor (47).

### **1.4.2 Citoquinas antiinflamatorias**

Las citoquinas antiinflamatorias, por otro lado, son moléculas inmunomoduladoras que regulan la respuesta provocada por las citoquinas proinflamatorias. De manera general, las citoquinas actúan en conjunto con inhibidores específicos de citoquinas y receptores de citoquinas solubles para regular la respuesta inmune. Dentro de las citoquinas antiinflamatorias más reconocidas se encuentran IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-11, IL-13 y el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1RA) (37). Además, receptores de citoquinas específicos para IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-18 también tienen un papel inhibitorio sobre algunas citoquinas proinflamatorias (48).

Las citoquinas antiinflamatorias definen la respuesta inmune de tipo 2, la cual se caracteriza por la presencia de linfocitos Th2, eosinófilos, mastocitos, y citoquinas, que pueden tener una actividad tanto protectora como patógena. Este tipo de inmunidad se ha identificado como un mecanismo protector en enfermedades autoinmunes ya que tiene la capacidad de suprimir la inflamación y daño tisular producidos por la respuesta inmune de tipo 1, así como de promover vías de señalización de reparación de tejidos (49). No obstante, cuando la respuesta inmune mediada por citoquinas de tipo 2 se encuentra desregulada y hay una sobreproducción de estas, se desarrollan diversas enfermedades asociadas principalmente con desórdenes alérgicos (50,51). En particular, IL-4, IL-10 e IL-13 activan la proliferación de linfocitos B y la producción de anticuerpos (47).

La respuesta inmune de tipo 1 y la de tipo 2 se regulan entre sí. Sin embargo, las citoquinas proinflamatorias IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-18, que inician y mantienen la respuesta inmune de tipo

1, son los principales mediadores que suprimen la inmunidad de tipo 2, mientras que las citoquinas antiinflamatorias suprimen el desarrollo de la inmunidad de tipo 1 frente a un amplio rango de patógenos virales y bacterianos, facilitando la continuidad de la infección (49). Específicamente, el IFN- $\gamma$  secretado por células Th1, suprime directamente la secreción de IL-4, y por ende, inhibe la diferenciación de células Th0 a células Th2. Por el contrario, IL-4 e IL-10 inhiben la secreción de IL-12 e IFN- $\gamma$ , evitando la polarización de células Th0 a células Th2 (47). Además, la supresión de la inmunidad de tipo 1 y del desarrollo de linfocitos T citotóxicos está asociada con promover el crecimiento de células tumorales (52).

También existen diferencias en los requisitos para la proliferación entre células Th1 y Th2. Los linfocitos T vírgenes y las células Th1 necesitan de IL-2 para su activación y proliferación; mientras que las células Th2 pueden hacerlo sin necesidad de IL-2, si IL-4 y/o IL-1 están presentes (53,54).

Por su parte, citoquinas como IFN- $\alpha$ , IL-6 y TGF- $\beta$  tienen un papel dual, y se pueden comportar como citoquinas pro o antiinflamatorias, dependiendo del contexto en el que ejercen su actividad biológica.

### **1.4.3 Tormenta de citoquinas**

Cuando se genera una respuesta inflamatoria descontrolada en la cual los niveles de citoquinas aumentan de forma anormal y desencadenan una reacción en cascada, se desarrolla un fenómeno conocido como “tormenta de citoquinas” o síndrome de liberación de citoquinas (CRS, por sus siglas en inglés). Este fenómeno se caracteriza por una respuesta proinflamatoria agresiva en combinación con una respuesta antiinflamatoria insuficiente, resultando en la pérdida de la homeostasis de la respuesta inmune (41).

Esta condición se asocia con una amplia variedad de enfermedades infecciosas y no infecciosas, como sepsis, síndrome de shock tóxico, síndrome de activación de macrófagos, entre otros (55). Dentro de las citoquinas clave que se han identificado en este fenómeno se encuentran TNF- $\alpha$ , interferones, IL-1 $\beta$ , MCP-1 (CCL2) e IL-6 (56).

La inflamación comienza de forma local y se expande a través del organismo mediante el sistema circulatorio, provocando los signos de la inflamación aguda mencionados previamente, debido a un aumento en el flujo sanguíneo, que ayuda a que leucocitos y proteínas plasmáticas alcancen los sitios extravasculares de daño (41,57). Este daño endotelial conlleva a la inducción de efectos secundarios como náuseas, fiebre, sarpullidos, hipoxia, hipotensión, y ocasionalmente disfunción renal y coagulopatía (58).

En la patogénesis propuesta de una tormenta de citoquinas, la activación y expansión de linfocitos T o la lisis de células inmunes promueve la liberación de IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$ , lo que a su vez induce principalmente la activación de macrófagos, células dendríticas y células endoteliales. Después de dicha activación, estas células producen otras citoquinas proinflamatorias. Una alta producción de IL-6 por macrófagos y células endoteliales activa los linfocitos T y otras células inmunes, y de este modo se crea un bucle de retroalimentación positiva que resulta tanto en la inducción de muchas más citoquinas y quimioquinas, como en un aumento de la expresión de proteínas de fase aguda, lo que genera una sobreestimulación del sistema inmune que resulta en una inflamación masiva e incontrolable (55,56,59,60).

De manera general, en la tormenta de citoquinas ocurre una pérdida de retroalimentación negativa en el sistema inmune, lo que resulta en un aumento en la producción de citoquinas inflamatorias, las cuales provocan una retroalimentación positiva en su propia producción y de este modo, la inflamación y la falla orgánica múltiple (61).

#### **1.4.4 Papel de las citoquinas en inmunoterapia**

Las citoquinas se han utilizado recientemente como un acercamiento para el tratamiento del cáncer en lo que se conoce como inmunoterapia, cuyo objetivo es estimular el sistema inmune y modular su respuesta para defender al organismo de las células cancerosas (62,63). Estos tratamientos se han administrado en pacientes con varios tipos de cáncer, obteniendo resultados promisorios (64,65).

Las citoquinas median interacciones clave entre las células inmunes y no inmunes en el microambiente tumoral. Entre el conjunto de citoquinas, muchas interleuquinas están involucradas en el desarrollo y progresión del cáncer, y presentan funciones pleiotrópicas de acuerdo con la diversidad de fuentes celulares que las producen, así como por los receptores, vías de señalización y dosis-dependencia particulares de cada una de ellas. Esto puede provocar que sus efectos sean específicos y estén relacionados tanto con la progresión como con el control tumoral, permitiendo su incursión en el desarrollo de terapias efectivas (66).

Por esta razón, se ha evaluado el papel de la terapia con citoquinas y su actividad antitumoral, especialmente en citoquinas Th1, incluyendo las familias de IL-1, IL-2 e IL-12, así como en G-CSF, GM-CSF, VEGF e IFN- $\gamma$ , entre otras, estableciendo que estas, solas o como adyuvantes, potencian los efectos antitumorales en modelos animales e impulsan la respuesta inmune (62,67); sin embargo, las respuestas en ensayos clínicos no han sido siempre positivas, ya que células inmunosupresoras en el microambiente tumoral pueden inducir la producción de citoquinas que inhiben la respuesta antitumoral, lo que genera limitaciones en la eficacia de este tipo de terapia, además de una alta toxicidad sistémica y efectos secundarios (62,68).

Por otro lado, se ha establecido que familias de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$ , juegan un papel dual en la respuesta inmune frente al cáncer, por lo que pueden presentar actividad supresora y antiinflamatoria en diferentes condiciones. Es por esto por lo que se hace necesario comprender mejor su rol y su mecanismo de acción previo al diseño de terapias de respuesta inmune basadas en estas (62,63,67).



## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo general**

Caracterizar el perfil de producción de citoquinas pro y antiinflamatorias inducidas por péptidos derivados de la proteína gp85 del virus de Epstein-Barr (VEB) en células mononucleares de sangre periférica humana.

### **2.2 Objetivos específicos**

Identificar los cambios en los niveles de expresión de ARN mensajero (ARNm) de citoquinas pro y antiinflamatorias, inducidos por péptidos derivados de la proteína gp85 del VEB en células mononucleares de sangre periférica.

Determinar los niveles de expresión a nivel de proteína de citoquinas pro y antiinflamatorias producidos por péptidos derivados de la proteína gp85 del VEB en células mononucleares de sangre periférica.

Establecer el efecto de péptidos derivados de la proteína gp85 del VEB sobre los marcadores de diferenciación celular asociados con cambios en el fenotipo en células mononucleares de sangre periférica humana.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1 Modelos biológicos

#### 3.1.1 Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMCs)

Las PBMCs incluyen linfocitos, monocitos y células dendríticas. Estas células son aisladas de sangre periférica mediante un gradiente de densidad, en donde permanecen en la fracción de baja densidad, mientras que los eritrocitos y las células polimorfonucleares son más densas y quedan en la fracción más baja del gradiente.

En humanos, la frecuencia de PBMCs varía entre individuos, sin embargo, los linfocitos se encuentran en el rango de 70-90%, los monocitos de 10-20% y las células dendríticas de 1-2%. Particularmente, en la población de linfocitos se encuentran rangos de 70-85% de linfocitos T CD3+, 5-10% de linfocitos B y 5-20% de células citolíticas naturales. Los linfocitos T CD3+ se componen por linfocitos T CD4+ y CD8+, que luego de su activación generan diferentes tipos de células regulatorias (69).

##### ▪ Obtención del cultivo de PBMCs

La evaluación del efecto de los péptidos se llevó a cabo en PBMCs extraídas a partir de muestras de *buffy coat* de voluntarios sanos en un rango de edad entre 20 y 30 años. Las muestras fueron donadas por el Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e Innovación en Salud – IDC BIS en donde el paquete globular de células blancas es normalmente desechado, en convenio con el Grupo de Inmunología y Medicina Traslacional perteneciente a la Facultad de Medicina. Las células se aislaron mediante gradiente de densidad con Lymphopure™ (BioLegend, Estados Unidos), por centrifugación a 800xg durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego de recuperar el anillo de PBMCs de la interfase, se realizaron tres lavados con medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco™, Estados Unidos) y se calculó el número de células viables por conteo en cámara de Neubauer empleando tinción con azul de tripán.

Se recuperaron las células y se cultivaron en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (SFB, Gibco™, Estados Unidos) al 10% (v/v), a 37°C y con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, en placas de cultivo de 12 pozos de fondo plano, a razón de 500.000 células/pozo y se incubaron con los péptidos 11438 y 33210 para los diferentes ensayos. Posterior al cultivo, se recuperaron las células, se centrifugaron a 300xg durante 5 minutos y los sobrenadantes obtenidos se conservaron a -70°C hasta su uso en la cuantificación de citoquinas. Posteriormente, se realizó extracción de ARN total para los ensayos de expresión diferencial.

### **3.1.2 Línea celular derivada de monocitos**

La línea U-937 (ATCC® CRL-1593.2™) es una línea celular tipo monocito (MCLC) derivada de células obtenidas a partir de derrame pleural de un paciente con linfoma histiocítico, utilizada generalmente como sustituto de PBMCs aisladas (70). Esta línea presenta propiedades de crecimiento en suspensión y morfología de monocitos y se ha establecido que presenta un fenotipo similar al expresado por PBMCs, representado por el perfil de expresión de marcadores de superficie. Además, ha sido caracterizada con base en niveles de expresión de ARNm de mediadores inflamatorios como citoquinas y quimioquinas (69,70).

La línea celular U-937, donada por la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC, Colombia), se cultivó y preservó en medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco™, Estados Unidos) suplementado con SFB (Gibco™, Estados Unidos) al 10% (v/v) de acuerdo con las indicaciones del fabricante (70). Las células se mantuvieron en suspensión a 37°C en una atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 5%.

## **3.2 Tratamientos**

La línea celular U-937 y PBMCs humanas fueron estimuladas con los péptidos 11438 y 33210, derivados de la glicoproteína gp85 del virus de Epstein-Barr (Tabla 3-1) a concentraciones entre 2 y 20 µM, y durante diferentes tiempos de estímulo en los distintos ensayos.

**Tabla 3-1** Secuencia de los péptidos utilizados.

Código del péptido	Secuencia
11438	YFVPNLKDMFSRAVTMTAAS
33210	FVFNLKDMFSRANRKRKA

Los péptidos fueron obtenidos mediante síntesis en fase sólida por la técnica de t-BOC (tert-butiloxycarbonilo) en el Núcleo Biotecnología Curauma (NBC) de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, en Chile. Una vez finalizada la síntesis, los péptidos fueron purificados mediante cromatografía líquida de fase reversa (RP-HPLC, Anexo A) y analizados por espectrometría de masas MALDI-TOF, para determinar el peso molecular esperado para cada péptido.

Específicamente para los ensayos de unión, se utilizó el péptido 11438 marcado con rodamina. Esta marcación se realizó durante el proceso de síntesis del péptido, en donde la molécula de rodamina fue añadida al extremo N-terminal de la secuencia peptídica.

Los demás ensayos en el presente trabajo se llevaron a cabo con los péptidos 11438 y 33210 sin marcación con rodamina.

### 3.3 Ensayo de unión del péptido 11438

#### 3.3.1 Ensayo de unión por citometría de flujo

Se realizó un ensayo de unión del péptido 11438 marcado con rodamina a PBMCs, para determinar la unión en las diferentes poblaciones celulares, establecidas por las diferencias en tamaño y complejidad de cada población. Se realizaron diluciones seriadas 1:3 del péptido marcado con rodamina en solución balanceada HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*). Las células se centrifugaron a 300xg durante 5 minutos, se resuspendieron en un buffer de PBS-BSA 1% a una concentración final de  $2 \times 10^6$  células/mL, se centrifugaron de nuevo, y posteriormente, se incubaron en oscuridad con las diluciones del péptido marcado, durante 30 minutos a 4°C y se procedió a la lectura por citometría de flujo (71). El análisis se llevó a cabo en un citómetro de flujo BD FACSAria™ III (BD

Biosciences, Estados Unidos) y la unión del péptido a las células se expresó en términos de la Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) de PE (*Phycoerythrin*, por sus siglas en inglés) para cada experimento. Los datos obtenidos fueron analizados con el software FlowJo V10.0.7 (Tree Star Inc.).

### 3.3.2 Ensayo de unión por microscopía de fluorescencia

Se realizó un ensayo de unión del péptido 11438 marcado con rodamina (73R) tanto en la línea celular U-937 como en PBMCs, para identificar su unión a nivel celular. Se sembraron  $1 \times 10^4$  células por pozo en una placa de 96 pozos, se lavaron con PBS y se bloquearon las uniones inespecíficas con PBS-BSA 1% durante 30 minutos. A continuación, se realizó una tinción con Hoechst 33342 (H3570, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) en concentración 0,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (72), y se realizaron dos lavados con PBS. Luego se incubaron las células con el péptido rodaminado a una concentración de 20  $\mu\text{M}$ , se realizaron dos lavados con PBS y se registraron las imágenes por microscopía de fluorescencia en el equipo EVOS M5000 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), tomando fotografías de 4 campos en cada pozo.

## 3.4 Análisis del potencial de membrana mitocondrial ( $\Psi\Delta\text{m}$ ) de PBMCs

Los cambios en el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) en PBMCs se evaluaron utilizando el colorante catiónico DiOC<sub>6</sub>(3), luego del tratamiento con los péptidos 11438 y 33210 a una concentración final de 20  $\mu\text{M}$  durante 24, 48 y 72 horas. Se sembraron  $2,5 \times 10^5$  células por pozo en una placa de 12 pozos y se incubaron con los péptidos. Una vez terminado el tiempo de incubación, se recuperaron las células y fueron teñidas solución de yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina (DiOC<sub>6</sub>(3); 10 nM) durante 15-20 minutos a 37°C en oscuridad (73). Como control positivo para la despolarización de la membrana mitocondrial, las células fueron expuestas a peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 4mM) durante 4 horas a 37°C (74). El análisis se llevó a cabo en un citómetro de flujo BD FACSAria™ III (BD Biosciences,

Estados Unidos) y el  $\Delta\Psi_m$  fue expresado por la MFI de DiOC<sub>6</sub>(3) en FITC para cada experimento. Los datos obtenidos fueron analizados con el software FlowJo V10.0.7 (Tree Star Inc.).

## **3.5 Análisis de la expresión génica de citoquinas**

### **3.5.1 Extracción de ARN**

El ARN se extrajo de PBMCs sembradas en placas de 12 pozos a una confluencia aproximada de 90% con y sin estímulos. Cada pozo se lavó con PBS frío, se recuperaron las células y se centrifugaron a 300xg durante 5 minutos, se extrajeron los sobrenadantes y las células se homogeneizaron en 300  $\mu$ L del reactivo TRIzol™ (Invitrogen, Estados Unidos). Después de la homogeneización se procedió a separar el ADN y las proteínas y se recuperó el ARN de las muestras mediante extracción con el método fenol-cloroformo (75,76). El ARN se precipitó con isopropanol y se lavó con etanol frío (75%, en agua libre de ribonucleasas). Finalmente, el ARN fue suspendido en agua libre de ribonucleasas. La cuantificación del ARN total se llevó a cabo en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) y su pureza se verificó según la relación de absorbancia 260/280 nm. Las muestras se preservaron a -70°C.

### **3.5.2 Transcripción reversa (RT-PCR)**

La síntesis de la cadena de ADN complementario (ADNc) se llevó a cabo a partir de 1,5  $\mu$ g de ARN total por muestra mediante el kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis System de acuerdo con las especificaciones del fabricante (#18080051, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

### 3.5.3 Optimización de primers (cebadores)

Los *primers* utilizados en la determinación de la expresión génica de citoquinas se evaluaron con las herramientas Primer-BLAST (77) y Sequence Manipulation Suite (78). Las secuencias tienen una longitud entre 19 y 23 pares de bases (pb), se encuentran en un rango de temperatura de anillamiento entre 56 y 60°C, tienen un %GC entre 40 y 65%, y un tamaño de amplicones menor a 150 pb.

La optimización de las condiciones de trabajo de cada par de *primers* se llevó a cabo con ADNc extraído de la línea celular U-937 (ATCC® CRL-1593.2™) y se realizó la verificación de las temperaturas de anillamiento utilizadas mediante qPCR y de los tamaños de los productos de amplificación para cada gen mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%.

### 3.5.4 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativo (qPCR)

Los cambios en la expresión génica se establecieron para los genes de *IL-4*, *IL-10*, *TNF- $\alpha$* , *IL-12B*, *GM-CSF (CSF-2)* y los genes de referencia *18S* y *UQCRC2*. Las reacciones de amplificación se realizaron con el sistema SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (#1725272, Bio-Rad, Estados Unidos) en el equipo CFX96™ (Bio-Rad, Estados Unidos). Esta técnica se basa en la propiedad del SYBR Green de intercalarse en el ADN de doble cadena, produciendo fluorescencia proporcional al monto de ADN presente en la reacción, por lo cual con cada ciclo de la reacción de PCR, la intensidad de la señal se incrementa de manera proporcional al producto (79). Para cada ensayo de qPCR se utilizó un volumen final de reacción de 3  $\mu$ L, según optimización del grupo de investigación. Las secuencias de los *primers* correspondientes a cada uno de los genes mencionados anteriormente se encuentran consignados en el Anexo B.

El programa de amplificación consistió en un paso inicial de denaturación a 95°C por 5 minutos, seguido de amplificación en 40 ciclos de 95°C durante 10 segundos, temperatura de anillamiento durante 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos. Al final se

realizó una curva de fusión para confirmar la presencia de un solo amplicón (Anexo B). Las curvas de calibración para los genes se realizaron utilizando diluciones seriadas de ADNc obtenidas a partir de todas las muestras analizadas y la eficiencia de la amplificación de cada gen se obtuvo a partir del software del fabricante en la fase exponencial de la curva de amplificación (Anexo B). El análisis de expresión se determinó empleando el método de Ct comparativo ( $\Delta\Delta Ct$ ) (79) y los resultados corresponden a la expresión relativa del gen blanco a la media geométrica de los genes de referencia. Como control positivo para la inducción de citoquinas, los modelos celulares se estimularon con Concanavalina A (10  $\mu\text{g/mL}$ ), durante 24 horas.

## **3.6 Análisis de la expresión proteica de citoquinas**

### **3.6.1 Determinación de citoquinas pro y antiinflamatorias**

Las citoquinas secretadas en muestras de sobrenadante de cultivo de PBMCs estimuladas inicialmente con los péptidos 11438 y 33210 a una concentración de 2  $\mu\text{M}$ , y posteriormente se evaluaron muestras con el péptido 33210 a una concentración de 20  $\mu\text{M}$ . Las muestras se cuantificaron utilizando el sistema BD™ CBA Human Inflammatory Cytokines Kit (CBA™, Cat. N° 551811, BD Biosciences, Estados Unidos). Se utilizó un panel de 6 citoquinas, que incluye IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 y TNF- $\alpha$ . Se siguieron las indicaciones del fabricante para la preparación de la curva de calibración y de las perlas de captura para los analitos. Las mediciones se llevaron a cabo en el citómetro de flujo BD FACSAria™ III (BD Biosciences, Estados Unidos) y las concentraciones de las citoquinas, expresadas en pg/mL, se establecieron con el software BD FCAP Array™ v3 (BD Biosciences, Estados Unidos).

## **3.7 Evaluación de cambios en el fenotipo por efecto de los péptidos en PBMCs**

### **3.7.1 Ensayo de proliferación de linfocitos**

Linfocitos obtenidos de PBMCs con una viabilidad mayor a 90 % en cámara de Neubauer se depositaron en un tubo Eppendorf de 1,5 mL. En la parte superior del tubo, se colocaron 100  $\mu$ L de medio RPMI y se agregó CSFE 1  $\mu$ M (por cada  $1 \times 10^4$  células, se adicionaron 0,4  $\mu$ L de CFSE). Se agitó con vórtex a baja velocidad, luego se incubaron las células durante 10 minutos en oscuridad y después se añadieron 500  $\mu$ L de medio RPMI con SFB 20 % por 10 minutos. Se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante, y las células se resuspendieron en medio RPMI con SFB 10 %. Se sembraron aproximadamente  $15 \times 10^2$  células por pozo en 100  $\mu$ L en una placa de 96 pozos de fondo redondo, en las cuales previamente se había añadido el estímulo correspondiente a los péptidos 11438 y 33210 en una concentración de 20  $\mu$ M, o fitohemaglutinina (PHA, por sus siglas en inglés) 10  $\mu$ g/mL (Sigma Aldrich, Estados Unidos), como mitógeno inductor de la proliferación. Las células fueron incubadas durante 5 días, se recuperaron y se realizó la lectura de las generaciones que proliferaron por citometría de flujo y su análisis se llevó a cabo haciendo uso del software FCS Express.

### **3.7.2 Evaluación de cambios en el fenotipo de linfocitos**

Se evaluó la inducción de cambios fenotípicos en linfocitos obtenidos a partir de 4 muestras de sangre periférica después del tratamiento con los péptidos 11438 y 33210 a una concentración final de 20  $\mu$ M. Se cultivaron  $5 \times 10^5$  PBMCs y se incubaron durante 48 y 72 horas a 37°C con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Una vez el tiempo de incubación finalizó, se recuperaron las células y fueron teñidas con los marcadores de superficie para linfocitos CD3 (Clone UCHT1, BioLegend, #300442, Estados Unidos), CD4 (Clone RPA-T4, BD Biosciences, #555347, Estados Unidos), CD8a (Clone RPA-T8, Thermo Fisher Scientific, #27-0088-73, Estados Unidos) y CD19 (Clone SJ25-C1, BD Biosciences, #557835, Estados Unidos), durante 20 minutos a 4°C en oscuridad. Posteriormente, se realizó un lavado con PBS, se resuspendieron las células y se procedió a realizar la lectura de cada

una de las muestras en el citómetro de flujo BD FACSAria™ III (BD Biosciences, Estados Unidos).

### 3.7.3 Evaluación de cambios en el fenotipo de monocitos

Se resuspendieron  $5 \times 10^5$  células mononucleares obtenidas a partir de muestras de sangre periférica en medio RPMI-1640 (Gibco™, Estados Unidos) en placas de 24 pozos y se incubaron durante dos horas a 37°C, con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, para permitir la adherencia de los monocitos en cada pozo. Después de este tiempo, se retiró el sobrenadante, que contiene la fracción celular no adherente. Posteriormente, a los monocitos adherentes se les adicionó medio RPMI-1640 suplementado con SFB 10% (v/v) y junto con los péptidos 11438 y 33210 a una concentración final de 20 µM. Como control positivo de diferenciación de células dendríticas derivadas de monocitos (MoDCs), se adicionó el medio de cultivo suplementado, enriquecido con GM-CSF (2,5 ng/mL) e IL-4 (1,25 ng/mL), teniendo en cuenta la proporción propuesta por Hajam I.A., et al., 2015 (80,81). Las células se incubaron durante 48 horas a 37°C con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Una vez terminado este tiempo de incubación, se reemplazó el medio y se adicionaron nuevamente los péptidos y las citoquinas en los pozos respectivos. Esto último se repitió una vez más, hasta completar siete días de incubación. De esta forma, se obtuvo la generación de células dendríticas inmaduras. Posteriormente, se adicionó el coctel de maduración de células dendríticas, el cual contenía IL-1β (10ng), TNF-α (1000 UI), IL-6 (1000 UI) y PGE2 (1 µg), durante 48 horas.

La derivación y maduración de monocitos a células dendríticas se verificó mediante tinción con anti-human CD11 (APC, Biolegend, Estados Unidos), CD83 (APC-Cy7, Biolegend, Estados Unidos) y CD80 (PE, Biolegend, Estados Unidos). El análisis se llevó a cabo en el citómetro de flujo BD FACSAria™ III (BD Biosciences, Estados Unidos) y los datos obtenidos fueron analizados con el software FlowJo V10.0.7 (Tree Star Inc.).

Adicionalmente, se realizó la verificación por microscopía de contraste de fases con el fin de evidenciar cambios en el fenotipo visibles, de acuerdo con el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos o células dendríticas.

### **3.8 Análisis estadístico**

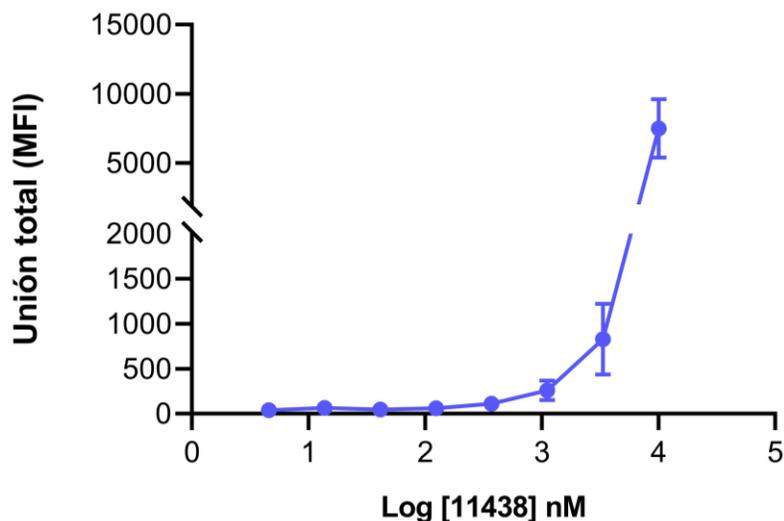
El análisis estadístico se llevó a cabo con el software GraphPad Prism versión 8.0.0 (GraphPad software, Estados Unidos). Los parámetros en las muestras obtenidas se examinaron mediante una prueba t de Student y un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías junto con la prueba de Dunnett, para establecer las diferencias entre los tratamientos y el control. Se realizó un duplicado biológico para cada ensayo y un valor de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ) se consideró estadísticamente significativo.

## **4. Resultados y discusión**

La evaluación de la expresión de citoquinas es fundamental para el estudio de la respuesta inmune y de los mecanismos de defensa y crecimiento celular normales. Teniendo en cuenta su importancia en estos procesos biológicos, se hace necesario estudiar cómo los cambios en su producción generan un impacto en el tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo el cáncer. Es por esto por lo que con el fin de caracterizar sus niveles de expresión por efecto de péptidos derivados de la glicoproteína gp85 del VEB, se utilizó un modelo biológico obtenido de PBMCs humanas.

### **4.1 Ensayo de unión del péptido 11438 a leucocitos humanos**

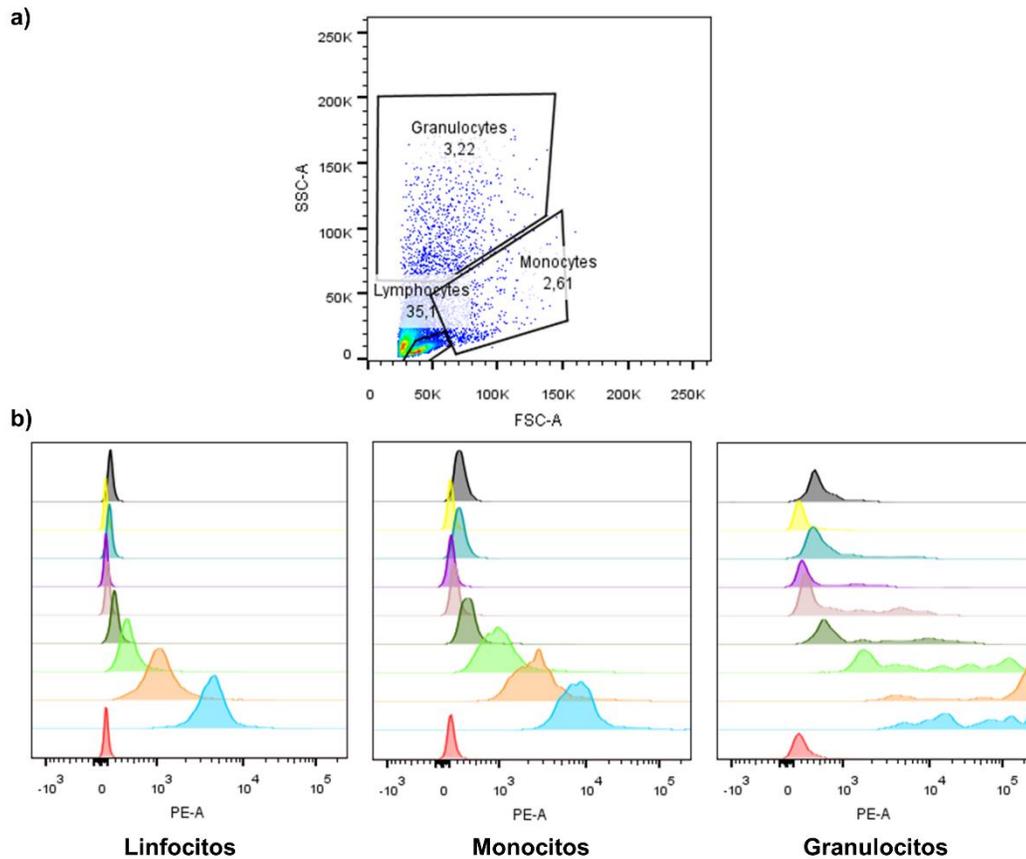
La secuencia del péptido 11438 pertenece a la región de unión de la glicoproteína gp85 (gH) a leucocitos de sangre periférica. Teniendo en cuenta esta característica particular, se trataron PBMCs de tres individuos sanos, con el péptido 11438 y se determinó la unión total de este a las células mediante citometría de flujo, tomando como parámetro de medición la intensidad media de fluorescencia (MFI) del péptido marcado con rodamina. Con el fin de establecer las concentraciones óptimas de unión de este, se evaluó un rango de 8 concentraciones del péptido que van desde 4,6 hasta 10.000 nM (Figura 4-1).



**Figura 4-1 Representación de la unión total del péptido 11438 a PBMCs totales.** La unión es expresada en el logaritmo de la concentración del péptido entre 4,6 y 10.000 nM. Los resultados se presentan en términos de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de la población positiva para la expresión del péptido marcado con rodamina. Las barras de error representan el error estándar de la media ( $\pm$ SEM)  $n=3$ .

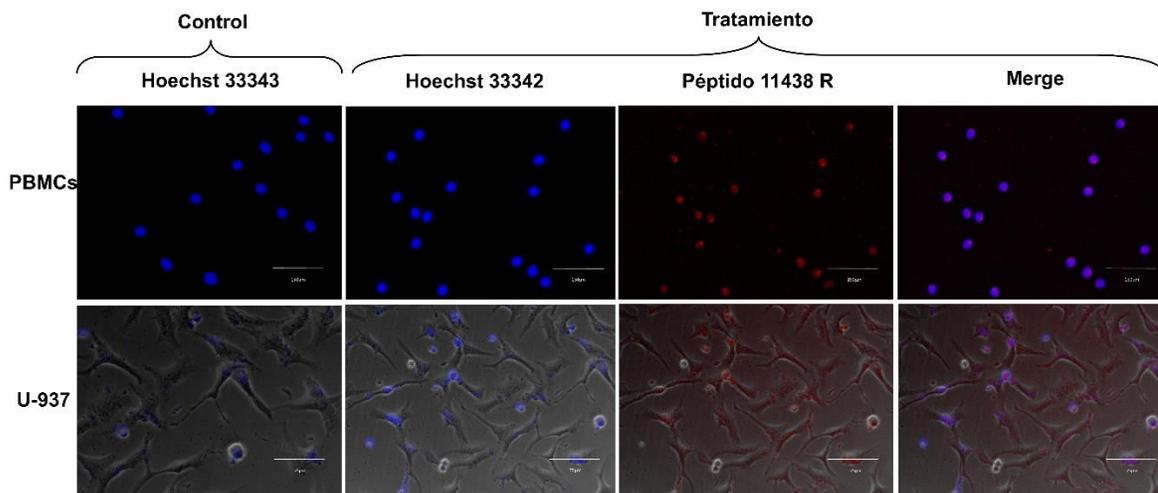
Los datos sugieren que este rango de concentraciones evaluado (desde nM hasta  $\mu$ M) asegura la unión del péptido 11438 a las células. A partir de esto, se estableció el intervalo de concentración para la evaluación de su actividad biológica en los ensayos posteriores, siendo el valor mínimo 2  $\mu$ M, y el máximo, 20  $\mu$ M, ya que fue posible evidenciar unión del péptido a la célula en estas dos concentraciones.

Adicionalmente, teniendo en cuenta las características de tamaño (FSC) y granularidad (SSC) de cada población celular identificada en PBMCs totales, se determinó la unión a distintas poblaciones clasificadas como monocitos, linfocitos y granulocitos (Figura 4-2). Los resultados indican que el péptido se une con afinidad a las tres poblaciones previamente definidas, lo que permitiría inferir que su acción biológica no está reducida solo a un tipo celular, sino que puede inducir una respuesta inmune conjunta asociada a distintas poblaciones celulares, cada una con sus correspondientes características y funciones.



**Figura 4-2 Representación de la curva de unión del péptido en diferentes poblaciones celulares.** a) Estrategia de *gating* para la identificación de poblaciones celulares en PBMCs mediante tamaño y granularidad de cada población definida. b) Histogramas representativos que indican la unión del péptido marcado con rodamina en tres poblaciones celulares: linfocitos, monocitos y granulocitos.

Para verificar la unión a leucocitos humanos, se realizó la identificación de la unión del péptido 11438 marcado con rodamina a leucocitos humanos mediante microscopía de fluorescencia, en PBMCs y en la línea celular pro-monocítica U-937 (Figura 4-3).



**Figura 4-3 Microscopía de fluorescencia representativa de la unión del péptido 11438 en PBMCs y en la línea celular U-937.** Las células fueron tratadas con el péptido marcado con rodamina, en una concentración de 20  $\mu\text{M}$ . Como control, se presentan las células sin estimular con el péptido marcado. La superposición (*merge*) de los canales sugiere co-localización a nivel nuclear. Barra de escala, PBMCs 150  $\mu\text{m}$ , U-937 75  $\mu\text{m}$ .

Las micrografías confirman que el péptido 11438 se une a estos dos modelos celulares, ya que es posible evidenciar la fluorescencia tanto de la rodamina como del colorante nuclear Hoechst 33342, aunque se desconoce su mecanismo de ingreso a la célula o de localización subcelular específica. Estudios han demostrado que el proceso de internalización de un péptido puede estar dado por dos procesos, bien sea por endocitosis o por translocación directa de la membrana (82). Además, se ha establecido que los péptidos localizados en el citoplasma tienen mayor acceso a la maquinaria de transporte nuclear y una menor probabilidad de ser degradados, en comparación con los péptidos que ingresan por endocitosis, los cuales pueden ser enviados fácilmente al lisosoma (83).

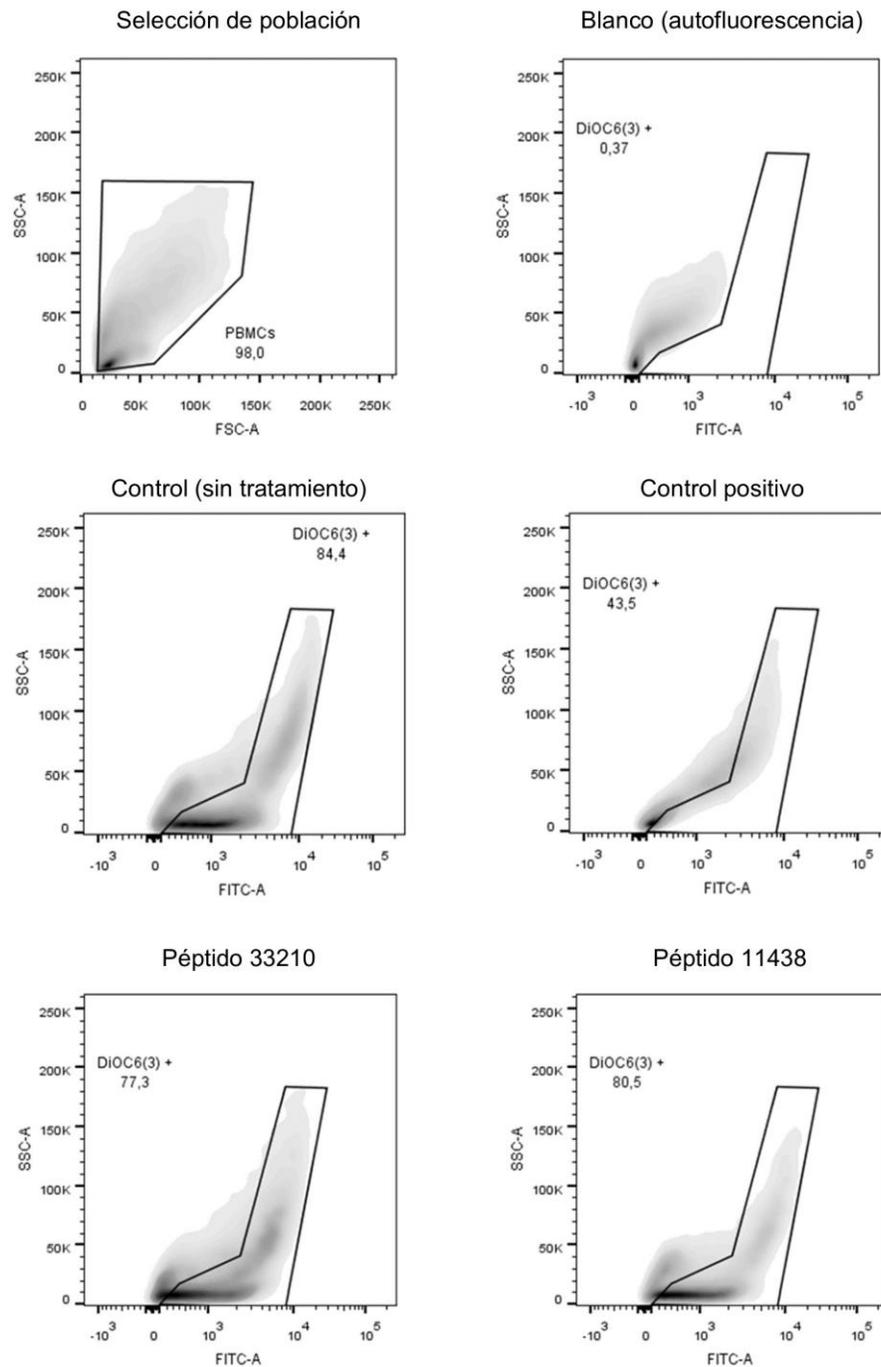
En los resultados obtenidos en este estudio, la superposición (*merge*) de las micrografías en los canales para la rodamina y Hoechst 33342, sugiere presuntamente que el péptido podría ingresar al citosol y localizarse a nivel nuclear (Figura 4-3), lo que permitiría validar también los resultados obtenidos mediante citometría de flujo que indican que el péptido se une a las células y que aparentemente está ingresando a la célula. Lo anterior, teniendo

en cuenta que el transporte de moléculas entre el citoplasma y el núcleo ocurre a través de los poros nucleares y que moléculas con tamaños menores a 60 kDa pueden difundirse pasivamente a través del canal central del poro nuclear (84). No obstante, se requiere profundizar en el estudio con relación al proceso de internalización y a la localización intracelular del péptido. Esto, debido a que tanto el transporte y los procesos de degradación de moléculas son dependientes de cada tipo celular y de su microambiente particular.

## **4.2 Análisis del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ )**

El potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) es un componente fundamental en el proceso de almacenamiento energético durante la fosforilación oxidativa y en la homeostasis mitocondrial, por lo que la estabilidad de los niveles de este parámetro está asociada con el funcionamiento normal de la célula, por lo que su alteración afecta de forma significativa el destino celular y la respuesta a distintos tipos de fármacos (85,86).

Para determinar si la membrana mitocondrial se ve afectada por efecto de los péptidos, se marcaron las células con el colorante DiOC<sub>6</sub>(3) (yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina), un colorante lipofílico permeable a la célula que se acumula en la mitocondria de células vivas y que tiene un rango de emisión de 484 a 501 nm (87). La reducción de la captación de DiOC<sub>6</sub>(3) se relaciona con la despolarización de la membrana mitocondrial y por ende, con la disminución en el  $\Delta\psi_m$  de células apoptóticas (88,89).

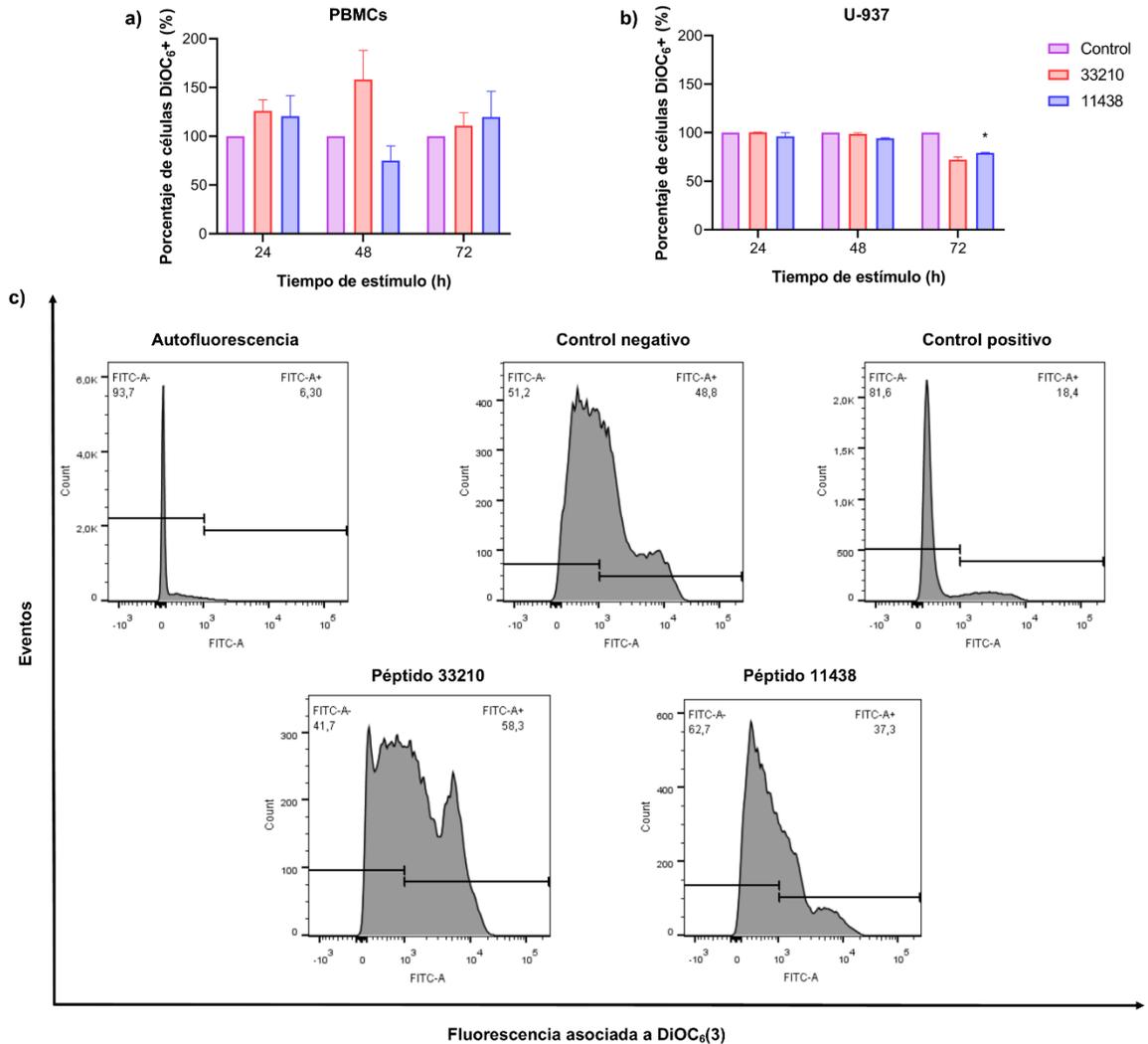


**Figura 4-4 Cambio en el porcentaje de expresión de DiOC<sub>6</sub>(3).** Gráficos representativos del cambio en el potencial de membrana mitocondrial de PBMCs totales mediante citometría de flujo por tinción con DiOC<sub>6</sub>(3). Control (sin tratamiento): células sin estimular

con los péptidos; Control positivo: células tratadas con peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 4 mM); Péptidos 33210 y 11438 (20  $\mu\text{M}$ ).

En la Figura 4-4 se observa el cambio en la fluorescencia del colorante catiónico DiOC<sub>6</sub>(3), dependiente del potencial de membrana mitocondrial, mediante cambios en el porcentaje de eventos en cada uno de los tratamientos realizados. Es posible establecer que en las células no tratadas hay un 84,4% de eventos correspondientes a células con mitocondrias funcionales, mientras que en aquellas tratadas con peróxido de hidrógeno este porcentaje disminuye a la mitad, reportando solamente un 43,5% de eventos. En la población de PBMCs tratadas con los péptidos 33210 y 11438 se evidencia una ligera disminución en este porcentaje del 7,1 y 4,3%, respectivamente, con respecto al control correspondiente a las células sin tratar, lo que indica que el tratamiento con los péptidos no induce la despolarización de la membrana mitocondrial de estas células.

Se realizó la evaluación del  $\Delta\psi_m$  tanto en PBMCs humanas como en la línea celular U-937 durante 24, 48 y 72 horas. Los resultados obtenidos permiten inferir que los péptidos 33210 y 11438 no presentan actividad citotóxica sobre los modelos evaluados en los tres tiempos de estímulo (Figura 4-5), estableciendo que estos no alteran el potencial de la membrana mitocondrial de las células.



**Figura 4-5 Evaluación de la actividad citotóxica de los péptidos 11438 y 33210.** Efecto citotóxico de los péptidos en **a)** PBMCs y **b)** línea celular U-937; **c)** Histogramas representativos de la detección del colorante en el canal FITC. Las células fueron estimuladas con los péptidos a una concentración de 20  $\mu$ M durante 24, 48 y 72 horas de estímulo, y el  $\Delta\Psi_m$  se determinó por tinción con DiOC<sub>6</sub>(3) mediante citometría de flujo. Se midió la intensidad media de fluorescencia (MFI) y se estableció el porcentaje de células con captación del colorante. Las barras de error representan la desviación estándar (S.D.) de tres ensayos diferentes. El análisis por ANOVA de dos vías con post-test de Dunnett mostró diferencias estadísticamente significativas (\* $p < 0,05$ ) por comparación entre los tratamientos y el control.

Es posible evidenciar que en PBMCs, los péptidos no provocan diferencias significativas en el cambio de la función mitocondrial, al comparar su comportamiento con la condición basal, por lo que se podría establecer que no presentan actividad citotóxica para este modelo celular.

No obstante, en los resultados es posible observar una tendencia de los péptidos a aumentar la captación del colorante catiónico, luego de 24, 48 y 72 horas de estímulo (Figura 4-5, **a**). Este comportamiento particular que indicaría una hiperpolarización de la membrana mitocondrial puede estar siendo generado por la activación de células como linfocitos T, los cuales son importantes en la respuesta inflamatoria, provocando una fuerza impulsora para permitir la entrada de calcio en el citosol. Se ha establecido previamente que la elevación del  $\Delta\Psi_m$  en estas células puede estar asociado tanto con eventos tempranos de apoptosis como con la activación celular, por lo cual representa un punto de control en el destino celular (90,91).

Dicho resultado también es indicativo de un alto estado energético de la mitocondria en la célula, el cual puede contribuir a un estado general elevado de activación e inflamación en PBMCs. Esto se puede relacionar con la producción de citoquinas proinflamatorias, las cuales están involucradas en el proceso de proliferación linfocitaria y activación de respuesta inmune tanto en linfocitos T como monocitos, generando un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno. Todo esto llevaría a un incremento de la actividad metabólica mitocondrial que controla diversos procesos como activación, proliferación y muerte celular programada (92,93).

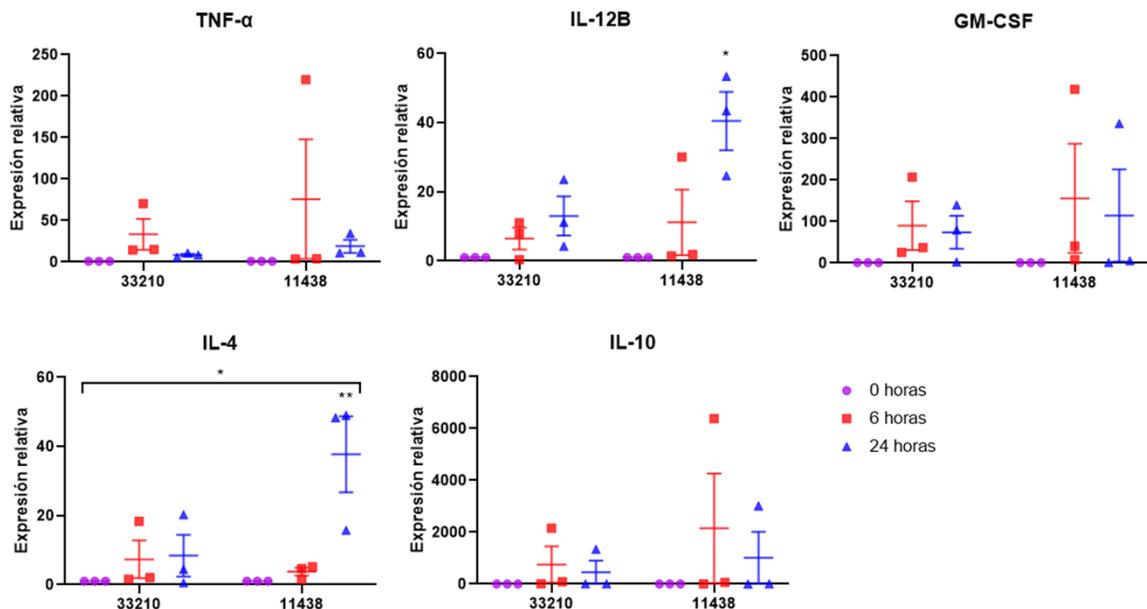
El comportamiento observado por los péptidos 11438 y 33210, y en particular por este último, de incrementar el potencial de membrana mitocondrial de PBMCs sanas podría ser debido a la inducción de una respuesta inmune inflamatoria y la activación celular, ya que se ha establecido que la activación de la respuesta antiinflamatoria en macrófagos, células dendríticas y otras células especializadas, mediada por citoquinas como IL-4 e IL-10, también puede generar alteraciones en el  $\Delta\Psi_m$ , lo cual se puede asociar con una mayor capacidad respiratoria (94–97).

En cuanto a la línea celular U-937, se observa que, de manera general, los péptidos tampoco afectan su función mitocondrial. Sin embargo, es posible establecer una reducción del porcentaje de células tratadas con el péptido 11438 del 6 % en comparación con el control, tras 72 horas de tratamiento (Figura 4-5, **b**)).

### **4.3 Análisis de la expresión génica de citoquinas**

Teniendo en cuenta el papel fundamental que juegan las citoquinas en la regulación del sistema inmune y como mediadoras de la inflamación, se realizó la evaluación de la expresión de citoquinas pro y antiinflamatorias en PBMCs estimuladas con los péptidos 33210 y 11438 mediante RT-qPCR.

Se realizó la extracción de RNA de PBMCs totales de tres individuos, las cuales fueron tratadas con los péptidos durante 6 y 24 horas a una concentración de 2  $\mu$ M. A estas muestras se les realizó una retrotranscripción para obtener cDNA, sobre el cual se realizó qPCR para verificar el cambio en la expresión de los genes que codifican para las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-12B, GM-CSF, IL-4 e IL-10 (Figura 4-6).

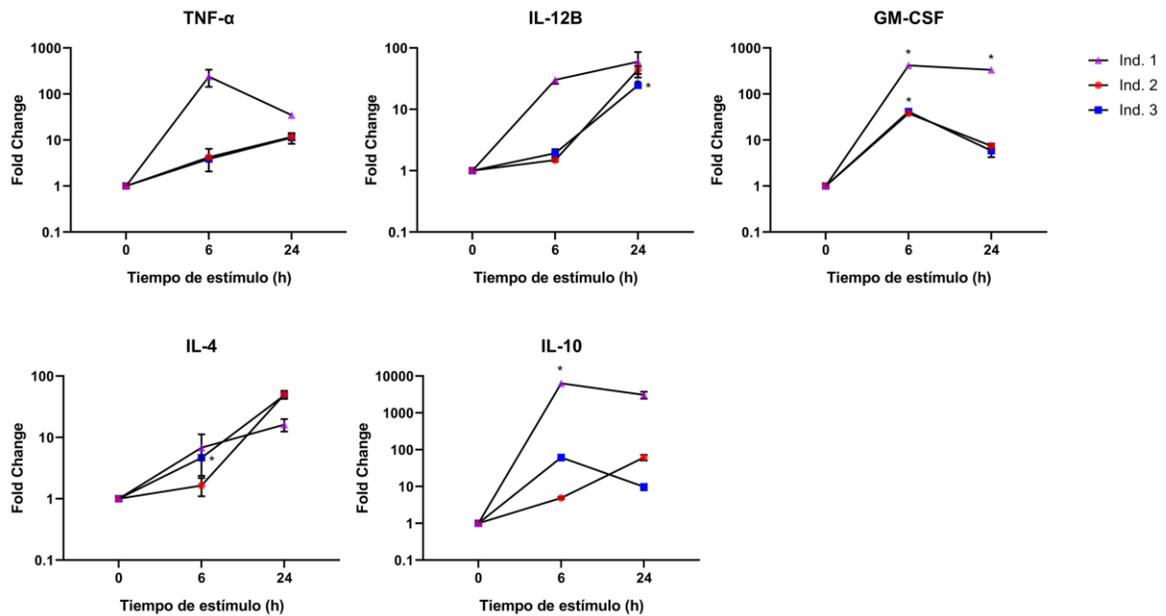


**Figura 4-6 Cambios conjuntos en la expresión génica de citoquinas pro y antiinflamatorias en PBMCs.** Las células fueron estimuladas con los péptidos 33210 y 11438 durante 6 y 24 horas a una concentración final de 2  $\mu$ M. Los valores se expresan como relación entre la expresión de los genes de interés y la media aritmética del gen de referencia RPS18. Las barras de error representan el error estándar de la media ( $\pm$ SEM)  $n=3$ . El análisis por ANOVA de dos vías con post-test de Dunnett mostró diferencias estadísticamente significativas (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ) por comparación entre los tratamientos y el control.

Del perfil de citoquinas de tipo Th1 se midió la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-12B y GM-CSF. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de ARNm de TNF- $\alpha$  y GM-CSF, sin embargo, se observó una tendencia al aumento en la expresión de estas citoquinas por efecto de los péptidos 33210 y 11438 en los dos tiempos evaluados especialmente a las 6 horas, en comparación con el control. Adicionalmente, se estableció un aumento significativo en los niveles de expresión génica de IL-12B en las células tratadas con el péptido 11438 después de 24 horas ( $p<0,05$ ), en comparación con el tratamiento a 6 horas y con el péptido 33210.

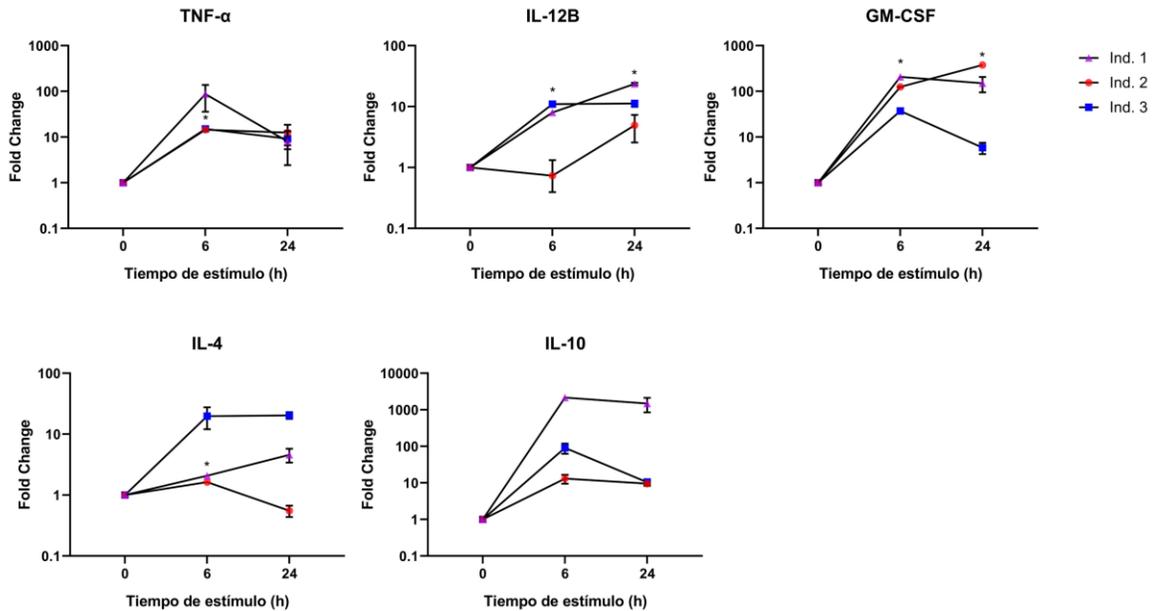
A continuación, se presenta el efecto particular de cada péptido en el perfil de citoquinas evaluado, teniendo en cuenta la respuesta individual de las tres muestras de PBMCs estimuladas con los péptidos (Figuras 4-7 y 4-8). Estos datos permiten inferir que se

presenta una tendencia al aumento en la expresión de las citoquinas evaluadas por efecto de los dos péptidos. En la figura 4-7, es posible evidenciar una tendencia al aumento de TNF- $\alpha$ , GM-CSF e IL-10 tras 6 horas de estímulo con el péptido 11438, la cual decae tras 24 horas de tratamiento con este, mientras que para el caso de las citoquinas IL-12B e IL-4, se puede observar un incremento en su expresión tras 6 horas de estímulo con el péptido 11438, el cual se mantiene y aumenta después de 24 horas de tratamiento.



**Figura 4-7 Cambios en la expresión génica de citoquinas pro y antiinflamatorias en PBMCs por efecto del péptido 11438.** Las células fueron estimuladas con el péptido 11438 durante 6 y 24 horas a una concentración final de 2  $\mu$ M. Las barras de error representan el error estándar de la media ( $\pm$ SEM). El análisis mediante la prueba t de Student mostró diferencias estadísticamente significativas (\* $p < 0,05$ ) por comparación entre los tratamientos y el control.

Por otro lado, en la figura 4-8, se puede evidenciar una tendencia al aumento de TNF- $\alpha$ , GM-CSF e IL-10 tras 6 horas de estímulo con el péptido 33210, la cual disminuye tras 24 horas de tratamiento con este, mientras que para el caso de la citoquina IL-4, se puede observar un incremento en su expresión tras 6 horas de estímulo con el péptido 33210, el cual después de 24 horas se mantiene, y para la citoquina IL-12B se observa un aumento progresivo tras 6 y 24 horas de estímulo con el péptido mencionado.



**Figura 4-8 Cambios en la expresión génica de citoquinas pro y antiinflamatorias en PBMCs por efecto del péptido 33210.** Las células fueron estimuladas con el péptido 33210 durante 6 y 24 horas a una concentración final de 2  $\mu$ M. Las barras de error representan el error estándar de la media ( $\pm$ SEM). El análisis mediante la prueba t de Student mostró diferencias estadísticamente significativas (\* $p < 0,05$ ) por comparación entre los tratamientos y el control.

Estos datos permiten establecer que los péptidos 11438 y 33210 inducen la expresión de citoquinas tanto pro- como antiinflamatorias en células de individuos sanos, y que este efecto se mantiene en el tiempo. Aun cuando en algunas citoquinas se observa un pico máximo de expresión a las 6 horas y una posterior disminución tras 24 horas de estímulo, es posible observar que en comparación con el control correspondiente a células sin tratamiento, la expresión de las citoquinas se encuentra aumentada.

La activación y diferenciación de las células del sistema inmune está regulada por cambios en la expresión génica, mediada por citoquinas reguladoras como IL-12 e IL-10. La citoquina IL-12 es un heterodímero compuesto por dos subunidades unidas por puentes disulfuro (p40 y p35). La citoquina IL-12B codifica para una subunidad común de los heterodímeros IL-12 e IL-23, y es conocida también como IL-12p40. La expresión de esta subunidad está restringida a pocos tipos celulares, como células dendríticas, monocitos y

macrófagos (98). La producción de esta citoquina, así como de otras citoquinas relacionadas con IL-12, a partir de células presentadoras de antígeno (APCs), como células dendríticas y macrófagos afecta el tipo de respuesta inmune tanto normal como patológica (99). Se ha descrito que la producción de esta citoquina es dependiente del medio y del estímulo utilizado; en donde IFN- $\gamma$  y GM-CSF potencian su producción, mientras que IL-10, prostaglandinas y TGF- $\beta$  la inhiben (100), por lo que el aumento en la expresión de esta citoquina después del tratamiento con el péptido 11438 podría estar dado por el nivel de expresión de la citoquina antiinflamatoria IL-10 en el mismo periodo de tiempo evaluado. IL-12 puede actuar como factor de crecimiento para linfocitos T activados, estando involucrada en la diferenciación de linfocitos T vírgenes a linfocitos Th1, y para células NK, potenciando su actividad citotóxica. Además, puede estimular la producción de IFN- $\gamma$  en PBMCs (101).

Con relación al perfil de citoquinas de tipo Th2, se midió la expresión de IL-4 e IL-10. Se encontró un aumento significativo de los niveles de ARNm de IL-4 en las células tratadas con el péptido 11438 después de 24 horas ( $p < 0,01$ ) y en general, por la interacción entre los péptidos en los dos tiempos evaluados ( $p < 0,05$ ); mientras que en el caso de IL-10 no se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los tratamientos con el control, en los tiempos evaluados, probablemente por el número de muestras utilizado.

La citoquina IL-4 también actúa como regulador de la respuesta inmune y es secretada principalmente por mastocitos, linfocitos Th2, eosinófilos y basófilos (102). Se ha establecido su papel fundamental en el desarrollo de la respuesta inmune antiinflamatoria, mediante la inducción de la diferenciación de linfocitos T vírgenes CD4+ a linfocitos Th2, sin embargo, también está involucrada en el crecimiento de linfocitos B, en la maduración de linfocitos T en el timo y en el aumento de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (*MHC*, por sus siglas en inglés) (103).

Los PBMCs tratados con estos péptidos aumentan la expresión de citoquinas con perfiles de respuesta distintos, tal como IL-12B e IL-4. Se conoce que estas dos citoquinas promueven la diferenciación de linfocitos T cooperadores diferencialmente hacia una respuesta inmune de tipo pro y antiinflamatoria, respectivamente. Como se ha

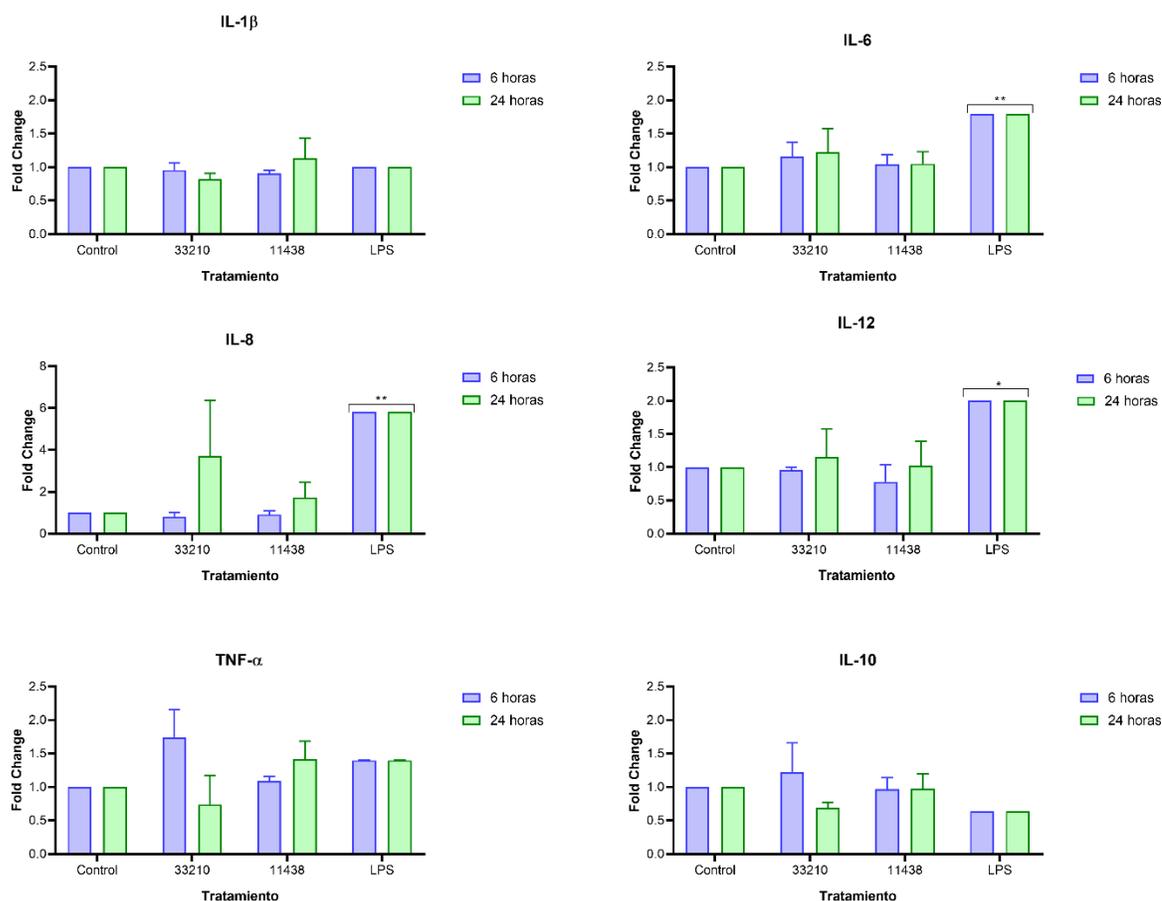
mencionado, mientras IL-12 induce la producción de IFN- $\gamma$  y la maduración de linfocitos Th1, IL-4 actúa como antagonista y favorece el desarrollo de linfocitos Th2 (104). No obstante, se han reportado estudios en los cuales se ha demostrado una cooperación entre estas dos citoquinas, en donde IL-12 puede incrementar la producción de IL-4, bajo ciertas circunstancias, y esta última puede inducir la producción de IL-12 por células presentadoras de antígeno (105–107).

Estos resultados sugieren que existe un sistema regulatorio que permite mantener una respuesta de citoquinas óptima y balanceada. Sin embargo, es importante resaltar el potencial de IL-4 para promover la diferenciación de linfocitos Th1, de forma indirecta, al potenciar la producción y actividad de IL-12 (100).

Además, como es conocido, la respuesta inmune involucra una red compleja de diferentes citoquinas, las cuales pueden actuar de manera autocrina o paracrina para inducir una respuesta y estas son producidas por distintos tipos celulares, lo que representa un amplio panorama para el estudio de su acción biológica.

#### **4.4 Análisis de la expresión proteica de citoquinas**

Con el fin de establecer la relación a nivel de proteína con los niveles de expresión génica obtenidos por RT-qPCR, se realizó el análisis del perfil de expresión de citoquinas secretadas en sobrenadantes de cultivo de PBMCs tratadas con los péptidos 11438 y 33210 que se encontraban con una concentración de 2  $\mu$ M, durante 6 y 24 horas. Los niveles de citoquinas se midieron haciendo uso del sistema Cytometric Bead Array (CBA), en el que se evaluó el panel de citoquinas referido en la metodología (Figura 4-9).



**Figura 4-9 Cambios en el perfil de expresión proteica de citoquinas pro y antiinflamatorias secretadas en PBMCs.** Las células fueron estimuladas con los péptidos 33210 y 11438 durante 24 horas a una concentración final de 2  $\mu$ M. El medio condicionado fue recolectado y analizado mediante citometría de flujo con el kit Human Inflammatory Cytokine Cytometric Bead Array (CBA). Los valores se expresan normalizados como relación entre la expresión de las proteínas de interés y la media geométrica del control (células sin estimular). LPS, Lipopolisacárido 10 ng/mL. Las barras de error representan el error estándar de la media ( $\pm$ SEM) n=3. El análisis por ANOVA de dos vías con post-test de Dunnett mostró diferencias estadísticamente significativas (\*p<0,05; \*\*p<0,01) por comparación entre los tratamientos y el control.

A partir de los resultados obtenidos es posible establecer que, con relación al péptido 33210 tras 6 horas de estímulo, hay una tendencia al aumento en IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10, en

comparación con el control, mientras que en IL-1 $\beta$ , IL-8 e IL-12 se observa una ligera disminución tomando como referencia el mismo parámetro. A las 24 horas de estímulo con este péptido se observa un aumento en IL-6, IL-8 e IL-12 y una tendencia a la baja en la expresión de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-10. Estos datos permiten establecer que, de manera general, la expresión de las citoquinas inflamatorias, en particular IL-6, tiende a aumentar por efecto del péptido 33210 en los dos tiempos evaluados.

Para el caso de los resultados obtenidos con el péptido 11438, se puede identificar que existe una tendencia al aumento de la expresión de las seis citoquinas evaluadas después de 24 horas de estímulo, en comparación con el control, aunque estos cambios no presenten significancia estadística. En cuanto a los resultados tras 6 horas de estímulo con el péptido, no se observan mayores diferencias en la expresión de las citoquinas al compararlas con las células sin estimular.

Además, se observó que el LPS estimuló la producción de todas las citoquinas proinflamatorias y provocó una disminución en la citoquina antiinflamatoria IL-10, en comparación con el control. No obstante, solo se presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$  y  $p < 0.05$ ) entre las células tratadas con LPS, respecto a los demás tratamientos, tal y como se ha descrito ampliamente en la literatura (108–110).

En conjunto, es posible establecer que los péptidos 33210 y 11438 inducen un ligero aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias en PBMCs tras 6 y 24 horas de estímulo, cuando se utilizan en una concentración de 2  $\mu$ M, lo que permitiría inferir la presencia de un ambiente inflamatorio que podría estar relacionado eventualmente con el inicio de la producción de una tormenta de citoquinas.

Para el caso particular de IL-10, que es una citoquina pleiotrópica que genera una respuesta antiinflamatoria e inmunosupresora (111), el aumento tras 6 horas de tratamiento con el péptido 33210 podría relacionarse con la expresión génica de esta citoquina y ser un indicativo de la regulación que se puede generar como respuesta a la producción de citoquinas proinflamatorias. Es interesante resaltar que los efectos de IL-10 son dependientes del contexto y se han demostrado diversos escenarios en donde IL-10 puede tener efectos estimulatorios sobre linfocitos T, relacionados con promover la proliferación de linfocitos T CD8, la actividad citotóxica y la producción de citoquinas proinflamatorias como IFN- $\gamma$  (112,113).

La concentración de 2  $\mu\text{M}$  de estos péptidos probablemente es muy baja ya que no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre la producción de citoquinas a nivel de proteína y sus niveles de expresión génica. No obstante, a partir de los datos obtenidos se ve que hay una tendencia general al aumento en la producción de un perfil de citoquinas inflamatorio, que puede llegar a tener efectos inmunomoduladores como respuesta a los estímulos realizados.

Esto se validó realizando un ensayo adicional mediante la misma técnica, en donde PBMCs sanos se trataron con el péptido 33210 a una concentración 10 veces mayor que la anterior, es decir, 20  $\mu\text{M}$ . Resulta interesante identificar que a esta concentración, el nivel de expresión de las citoquinas aumenta significativamente, en comparación con el control. Se observa un incremento en la producción de las citoquinas IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-10, que en general indica de nuevo un perfil predominantemente proinflamatorio (Figura 4-10).

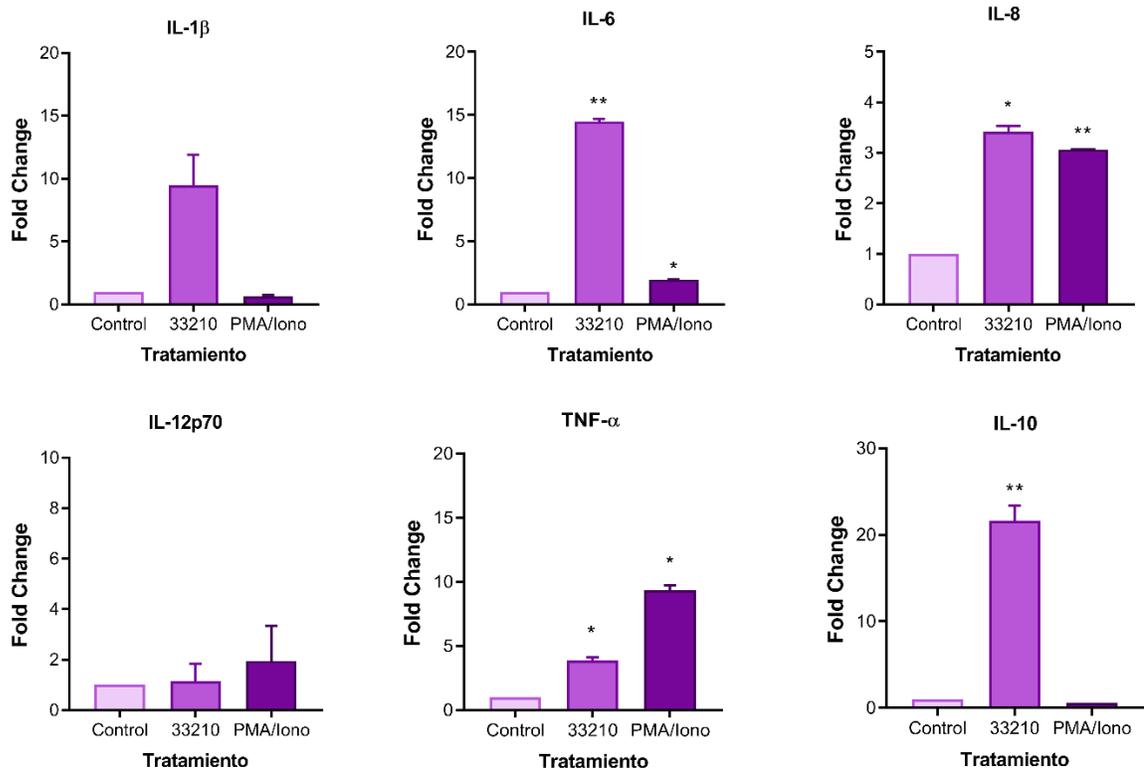
El aumento en algunas de estas citoquinas está asociado con el aumento de la transcripción de estos genes, de acuerdo con los resultados obtenidos mediante RT-qPCR, así como con un aumento en la traducción, evidenciado por los niveles de proteína obtenidos. El aumento en la expresión de IL-6 por efecto de los péptidos es importante en el estudio de la respuesta inflamatoria, ya que esta citoquina es un fuerte inductor de respuestas de fase aguda y presenta propiedades pro- o antiinflamatorias dependientes del contexto (114). Además, está involucrada en los procesos de diferenciación de monocitos, preferencialmente hacia macrófagos (115). Esto destaca la importancia de esta citoquina y el papel que puede tener en diversos procesos celulares, incluyendo su participación en la inducción de una tormenta de citoquinas (116).

En este sentido también se resalta el aumento en la expresión de TNF- $\alpha$ , ya que se conoce que existen citoquinas que pueden promover o inhibir el desarrollo de tumores, independientemente de su fuente, entre las que se encuentra esta citoquina en particular (117,118). TNF- $\alpha$  es una citoquina proinflamatoria producida principalmente por células derivadas de la línea mieloide como monocitos, macrófagos y células dendríticas, aunque otros tipos celulares como linfocitos T también la producen bajo diferentes condiciones. Es un potente mediador de la inflamación y tiene efectos en diferentes funciones patológicas

y fisiológicas. Se ha determinado que activa los macrófagos en el sitio de inflamación induciendo la liberación de otras citoquinas proinflamatorias que incrementan la respuesta inflamatoria además del factor de transcripción Factor Nuclear Kappa  $\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ), que estimula la proliferación celular y su supervivencia (119).

TNF- $\alpha$  es una molécula efectora importante en la muerte mediada por ciertas células tumorales, pero también actúa como un factor promotor de tumores cuando existe una exposición crónica. Estos efectos opuestos parecen estar relacionados con la concentración local de la citoquina, así como también las vías de señalización que se activan. Altas dosis de TNF- $\alpha$  inducen necrosis de tumores singénicos (119). Por el contrario, dosis bajas de TNF- $\alpha$  provocan angiogénesis y promueven la progresión tumoral. Esta citoquina también está involucrada en la inducción de la transición epitelial-mesenquimal (*EMT*, por sus siglas en inglés), el cual es un paso preliminar importante en el crecimiento invasivo; y confiere un fenotipo que promueve la invasión en células epiteliales de mamíferos, así como la metástasis (120).

Teniendo en cuenta los datos obtenidos, se resalta que los péptidos 11438 y 33210 inducen la expresión de un perfil de citoquinas proinflamatorio, la cual se mantiene en el tiempo. Este efecto es de gran importancia ya que permitiría establecer un posible acercamiento al tratamiento de diversas patologías mediante la estimulación del sistema inmune, de modo que sea posible, por ejemplo, intervenir en el tratamiento de enfermedades como el cáncer haciendo uso de moléculas como los péptidos mencionados en este estudio. Lo anterior, tomando como referencia el hecho de que estos no provocan un efecto citotóxico en células sanas, y que la expresión de citoquinas proinflamatorias puede modular procesos como la activación de linfocitos T, con el fin de regular la aparición de señales supresoras del sistema inmune.



**Figura 4-10 Expresión de citoquinas inflamatorias a nivel de proteína.** Niveles de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12p70, TNF- $\alpha$  e IL-10 en sobrenadante de cultivo de PBMCs estimuladas con el péptido 33210 a una concentración de 20  $\mu$ M durante 24 horas. Las barras de error representan el error estándar de la media ( $\pm$ SEM). El análisis de una vía ANOVA con post-test de Dunnett mostró diferencias significativas (\* $p$ <0,05, \*\* $p$ <0,01) por comparación entre los tratamientos y el control. Control, células no tratadas; PMA/Iono, PMA/Ionomicina.

## 4.5 Evaluación de cambios en el fenotipo por efecto de los péptidos en PBMCs

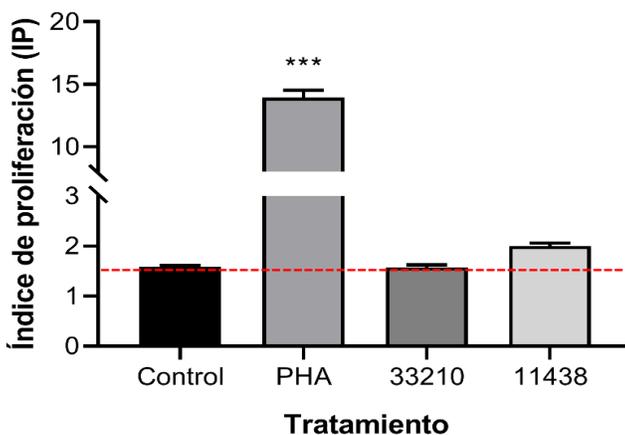
### 4.5.1 Evaluación de cambios en el fenotipo de linfocitos

Los linfocitos son uno de los grupos celulares que juegan un papel importante en la respuesta inmune frente a las infecciones. Los linfocitos se dividen en linfocitos B y linfocitos T, principalmente, y estos a su vez se pueden dividir en poblaciones más

específicas. Dichas poblaciones pueden experimentar cambios fenotípicos en respuesta a diferentes estímulos, como distintos antígenos o la activación de citoquinas.

En este caso, se evaluó el efecto que producen los péptidos 33210 y 11438 en la expresión de moléculas de superficie características de ciertas poblaciones de linfocitos como linfocitos B (CD19) y linfocitos T (CD3), y en particular, linfocitos T cooperadores (CD4) y linfocitos T citotóxicos (CD8). La producción de cambios en estas células es fundamental para el desarrollo de una respuesta inmune efectiva así como para la memoria inmunológica.

Inicialmente, se realizó la evaluación del cambio en la proliferación de linfocitos por efecto de los péptidos. Las PBMCs se pusieron en contacto con los dos péptidos (20  $\mu$ M) y se cuantificó el índice de proliferación con el programa FCS Express V.7. Como control positivo de proliferación de linfocitos se utilizó el mitógeno fitohemaglutinina (PHA, 10  $\mu$ g/mL), el cual provocó una respuesta positiva por parte de las células tratadas. Como control se tomaron células sin tratamiento y se estableció la proliferación basal como parámetro clave para considerar a partir de los resultados que un índice de proliferación  $IP > 1,59$  es significativo para indicar que hubo expansión clonal (Figura 4-11).



**Figura 4-11 Índice de proliferación por efecto de los péptidos 33210 y 11438.** La gráfica presenta los datos de proliferación de linfocitos estimulados con los péptidos a una concentración de 20  $\mu$ M, en comparación con aquellos sin tratar (Control). Como control positivo se utilizó PHA (Fitohemaglutinina, 10  $\mu$ g/mL). La línea punteada que se extiende sobre el eje X corresponde al valor  $IP = 1,59$ , el cual es el límite para la determinación de

proliferación celular. Las barras de error representan la desviación estándar ( $\pm$ S.D.) de datos por triplicado. El análisis por ANOVA de una vía con post-test de Dunnett mostró diferencias estadísticamente significativas ( $***p < 0,001$ ) por comparación entre el control positivo y el control de células sin estimular.

Adicionalmente, se evaluó la producción de cambios en marcadores de superficie de distintas poblaciones de linfocitos estimulados con los péptidos tras 48 y 72 horas de tratamiento (Figura 4-12, **a**)).

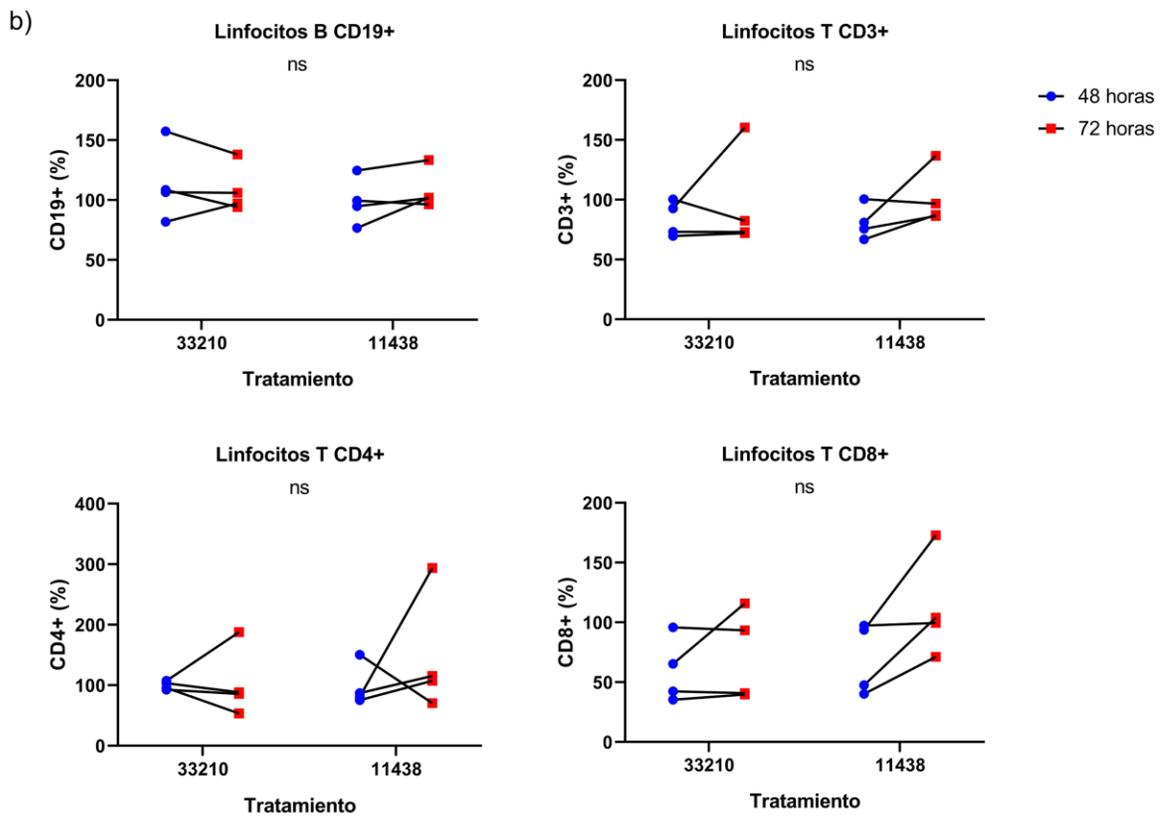
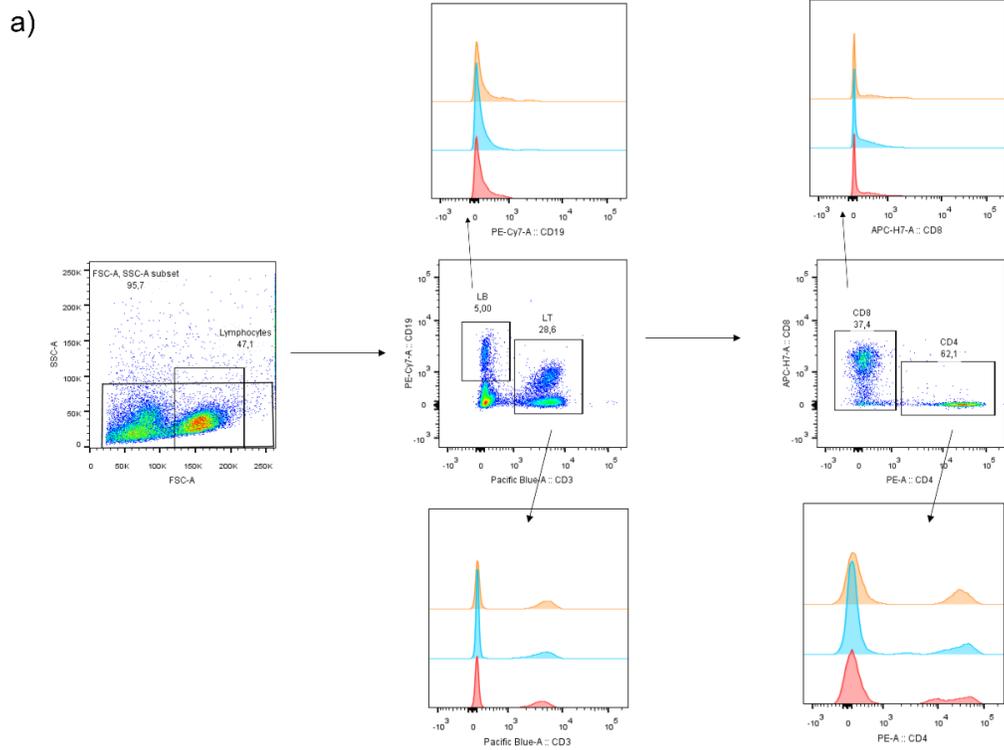
En este caso, es posible establecer que los péptidos no inducen cambios estadísticamente significativos sobre el fenotipo linfocitario de PBMCs de individuos sanos (Figura 4-12, **b**)). Los datos fueron normalizados con el control de cada tiempo evaluado, el cual correspondería al 100 % de expresión de cada marcador.

Para empezar, el marcador de superficie CD19 es una molécula expresada por linfocitos B, el cual no presenta modificaciones en su porcentaje de expresión en ninguno de los dos tiempos evaluados. Se han realizado estudios relacionados con el efecto de la infección por el VEB en linfocitos B, en donde se ha demostrado que, en los primeros tres días de infección, estas células no han proliferado, y que a partir del cuarto día de infección, se evidencian algunos cambios fenotípicos (121). Si bien en este estudio no se ha realizado la evaluación del efecto por infección con el virus, sería posible inferir que la respuesta a péptidos derivados de una proteína de unión de este podría estar asociada con el comportamiento previamente mencionado. No obstante, se requerirían más estudios a este respecto.

En cuanto al marcador de linfocitos T CD3, se observa un cambio al disminuir después de 48 horas de estímulo, y luego presentar una tendencia al alta en su expresión por efecto de los dos péptidos luego de 72 horas. Esta modificación en su expresión, aunque no es significativa, podría estar relacionada inicialmente con la producción de citoquinas inflamatorias que los péptidos generan, ya que estas tienen efectos inmunoestimuladores sobre linfocitos T (122). Dependiendo de la dinámica en la expresión de citoquinas regulatorias por células estimuladas con distintos antígenos, la respuesta inmune puede variar hacia un perfil pro o antiinflamatorio, y con esto, tener un efecto en diferentes poblaciones celulares, incluyendo los linfocitos.

Es conocido que IL-4 tiene la capacidad de co-estimular el crecimiento de linfocitos B *in vitro*, así como el crecimiento y desarrollo de linfocitos T y puede inducir potencialmente la actividad citolítica de estas células, además de la diferenciación de linfocitos T CD4+ hacia linfocitos Th2 (123). Asimismo, IL-12 también está involucrada en la diferenciación de linfocitos T, pero hacia un perfil Th1, y promueve la actividad citotóxica de células NK y linfocitos T CD8+ (124), por lo que la producción de estas citoquinas podría influir en cambios en la expresión de linfocitos, dependiendo de su concentración.

En particular, sobre las poblaciones de linfocitos T colaboradores (CD4) y citotóxicos (CD8) es posible evidenciar que el porcentaje de los primeros tiende a aumentar tras 72 horas de estímulo con el péptido 11438, mientras que para el caso de los linfocitos T CD8, se observa una tendencia a incrementar su porcentaje tanto con el péptido 33210 como con el 11438 en el mismo tiempo evaluado. Este comportamiento podría estar relacionado con la respuesta de los linfocitos a los péptidos y a la expresión de citoquinas inflamatorias que provocan la activación de estas poblaciones celulares y que eventualmente, podrían ser utilizadas en conjunto para el tratamiento de patologías como el cáncer (125). No obstante, se requieren mayores estudios a este respecto ya que el efecto de cada citoquina sobre la población puede ser diferente, dependiendo del contexto.

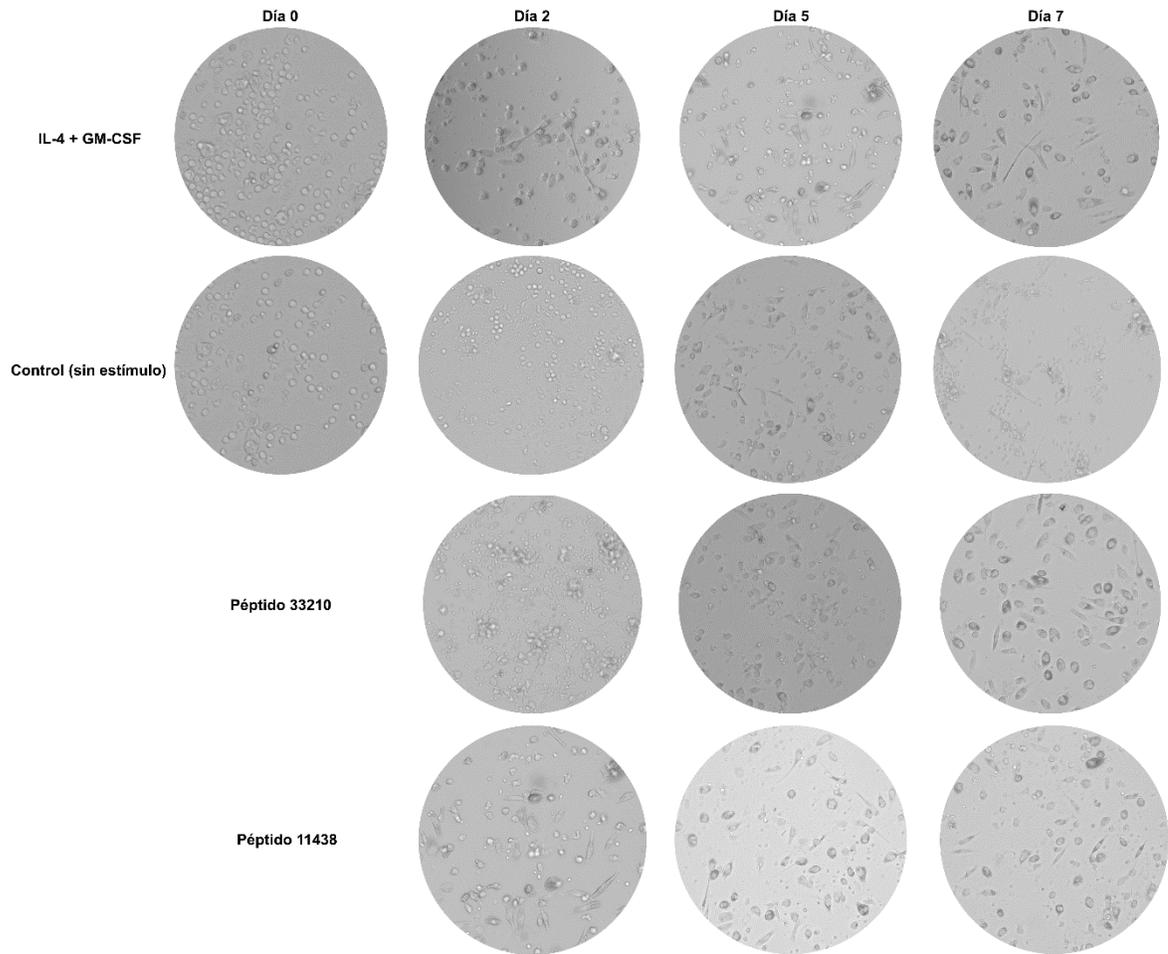


**Figura 4-12 Efecto de los péptidos 33210 y 11438 en el perfil de linfocitos. a)** Estrategia de *gating* para la determinación del cambio en el perfil de linfocitos humanos por efecto de los péptidos 33210 y 11438. **b)** Cambios en la expresión de los marcadores de superficie de linfocitos CD19+, CD3+, CD4+ y CD8+ en PBMCs tratados con los péptidos 33210 y 11438 después de 48 y 72 horas de tratamiento. Las barras de error representan el error estándar de la media ( $\pm$ SEM)  $n=4$ . El análisis por ANOVA de dos vías con post-test de Tukey no mostró diferencias estadísticamente significativas por comparación entre los tratamientos y el control.

#### 4.5.2 Evaluación de cambios en el fenotipo de monocitos

Para determinar si los péptidos 11438 y 33210 ejercen un efecto sobre el estado morfológico y fenotipo de monocitos, se trataron estas células, aisladas de PBMCs, con los péptidos en un periodo de 7 días. Los monocitos aislados por gradiente de Ficoll fueron tratados con los péptidos y estuvieron en presencia de de 2,5 ng/mL de GM-CSF y 1,25 ng/mL de IL-4, con el fin de establecer si estos inducen la transformación a células dendríticas (DCs). En este tiempo fue posible evidenciar el cambio del fenotipo pasando de monocitos a macrófagos y finalmente, la obtención de células dendríticas inmaduras, características que fueron evaluadas mediante microscopía por contraste de fases (Figura 4-13) y por marcación de las moléculas de superficie CD80, CD83 y CD11c (Figura 4-14).

Las células observadas por microscopía permitieron establecer una morfología esférica para los monocitos, la cual entre 3 y 5 días después se modificó de manera que las células presentaron un alargamiento con forma similar a una aguja, el cual es característico de macrófagos. Adicionalmente, los monocitos que fueron estimulados con un pulso del cóctel estándar de maduración para obtener células dendríticas presentaron también un cambio en su morfología, pasando de una forma esférica hasta el día 3 de estímulo, y luego hasta el día 7 tomaron una forma alargada similar a los macrófagos, con la característica adicional de presentar pseudópodos cortos y la formación de agregados celulares (Figura 4-13). Esto permite sugerir la diferenciación de células dendríticas ya que es conocido que su fenotipo se modifica según los distintos estados de maduración y activación por los que pase la célula.



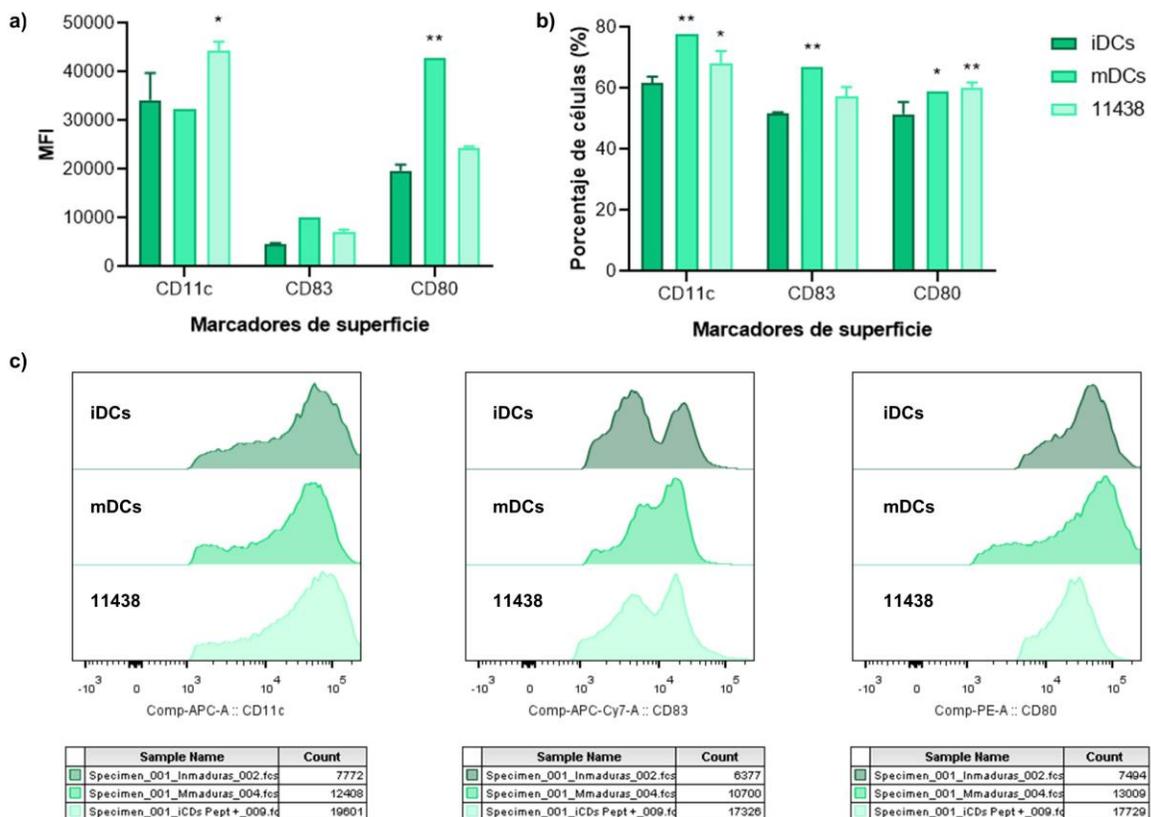
**Figura 4-13 Microfotografías representativas de la obtención de células dendríticas.** Los monocitos aislados de PBMCs fueron cultivados por un periodo de 7 días y estimulados con los péptidos 33210 y 11438 para evaluar el efecto de estos sobre cambios en su fenotipo. Las microfotografías corresponden a imágenes tomadas en el día 0, día 2, día 5 y día 7, en donde se observan cambios morfológicos característicos de células dendríticas inmaduras.

Adicionalmente, se realizó el análisis de la transformación de células dendríticas derivadas de monocitos (MoDCs) así como la evaluación del efecto del péptido 11438 sobre estas células, mediante la expresión de los marcadores de superficie CD11c, CD83 y CD80. La distinción entre células dendríticas inmadura y maduras se puede establecer gracias a su plasticidad morfológica, ya que pueden pasar de un estado adherente cuando están en contacto con GM-CSF e IL-4, a un estado no adherente cuando maduran, por ejemplo, por efecto de TNF- $\alpha$  (126).

En ese orden, las células dendríticas estimuladas con el péptido 11438 mostraron un perfil maduro por inducción con el coctel de maduración referido en la metodología. Este perfil se observó por un aumento en la expresión de la molécula de superficie CD11c, la cual es común también en monocitos y macrófagos, así como en la molécula CD83 y en la molécula co-estimuladora CD80, las cuales son marcadores que indican maduración en las células dendríticas.

La expresión de estos marcadores refleja la obtención de células dendríticas maduras ya que la expresión de CD80 y CD83 en las células tratadas con el coctel de maduración, en comparación con aquellas sin este tratamiento, es significativamente mayor, como se observa por cambios en la intensidad media de fluorescencia (MFI) de cada marcador (Figura 4-14 **a**) y por el porcentaje de células positivas para cada uno de ellos (Figura 4-14 **b**)).

Por otro lado, resulta interesante ver el efecto que tiene el péptido 11438 sobre esta población celular, ya que en comparación con las células dendríticas inmaduras, induce un aumento en la expresión de los tres marcadores de superficie evaluados, permitiendo establecer que este péptido está involucrado en procesos de diferenciación celular.



**Figura 4-14 Efecto del péptido 11438 sobre monocitos aislados de PBMCs. a)** Cambios en la expresión de los marcadores de superficie CD11c, CD83 y CD80 en MoDCs tras estímulo con el péptido 11438 y pulsos de GM-CSF e IL-4, en un periodo de 7 días, con base en la intensidad media de fluorescencia (MFI) de cada marcador. **b)** Cambios en el porcentaje del número de células asociado a cada marcador evaluado. Las barras de error representan el error estándar de la media ( $\pm$ SEM)  $n=2$ . El análisis por ANOVA de dos vías con post-test de Dunnet mostró diferencias estadísticamente significativas por comparación entre los tratamientos y el control ( $*p<0,05$ ,  $**p<0,01$ ). **c)** Histogramas representativos del cambio en la expresión de los marcadores de superficie mencionados. iDCs, células dendríticas inmaduras (control); mDCs, células dendríticas maduras; 11438, tratamiento con el péptido 11438 a 20  $\mu$ M.

El papel que juegan las células dendríticas en la respuesta inmune es fundamental ya que estas son conocidas por ser APCs por excelencia, las cuales inician, coordinan y regulan la respuesta inmune innata y adaptativa (127). Las células dendríticas expresan moléculas

co-estimuladoras que tienen la capacidad de activar linfocitos T vírgenes y además estimulan la producción de algunas citoquinas como IL-12, IL-23 o IL-10, lo que permite la activación o inhibición de la APC en el proceso de presentación de antígeno, así como polarizar la diferenciación hacia distintos perfiles de linfocitos como Th1, Th2, Treg o Th17, dependiendo de las citoquinas que produzcan y de las moléculas de superficie que expresen (128).

Las MoDCs pueden presentar antígenos en el contexto tanto de MHC clase I y MHC clase II, lo que las hace un modelo terapéutico llamativo para el desarrollo de, por ejemplo vacunas contra el cáncer. Recientemente, se ha resaltado su papel en la inmunoterapia tanto por la activación de linfocitos T CD4+ y CD8+, como por la expansión de linfocitos T citotóxicos, lo que puede llevar a generar inmunidad antitumoral (129,130), haciéndolas blancos prioritarios para la modulación en este tipo de terapias. Sin embargo, este es un campo de estudio bastante amplio que todavía requiere el desarrollo de estrategias que permitan mejorar su efectividad y su aplicación a nivel clínico.

Esto, debido a que existen algunas limitaciones para el uso de MoDCs en distintos tratamientos de enfermedades, entre las que se incluyen el alto costo de los cocteles de citoquinas, la composición del medio condicionado de los monocitos, el cual es muy variable según las condiciones, entre otras (131).

Según los resultados obtenidos en este acercamiento, el péptido 11438 puede ser capaz de inducir una señal al medio celular, lo suficientemente alta para contribuir en la diferenciación de monocitos a células dendríticas, ofreciendo algunas ventajas para la generación de MoDCs frente a métodos convencionales, tales como un menor costo de producción del péptido en comparación con el uso de cocteles de maduración a gran escala. Se resalta su importancia como posible agente terapéutico o coadyuvante en el tratamiento de diversas patologías, con base en la estimulación del sistema inmune, y en la producción de un perfil de citoquinas definido.

## 5. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

El presente estudio realiza un aporte a las investigaciones en la obtención y evaluación de la actividad de moléculas con capacidad de regular la respuesta inmune en células humanas, asociada con los cambios en el perfil de expresión de citoquinas pro y antiinflamatorias, por efecto de péptidos derivados de la proteína gp85 del VEB. Los resultados de esta investigación permitieron concluir que:

- Los péptidos 33210 y 11438 no presentan un efecto citotóxico sobre PBMCs sanas e inducen un aumento significativo en la expresión génica de citoquinas pro y antiinflamatorias, como IL-12B e IL-4, respectivamente, indicando una regulación mixta de las citoquinas.
- El péptido 33210 contribuye significativamente con el aumento en la expresión a nivel de proteína de citoquinas inflamatorias, como IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ , cuando las células son tratadas con este a 20  $\mu$ M, lo que podría estar relacionado con el cambio en su secuencia de aminoácidos, en comparación con el péptido 11438. No obstante, para este último fue posible identificar una tendencia al alta en la producción de estas citoquinas al estimular las células con la concentración evaluada.
- El estudio del efecto de los péptidos 33210 y 11438 sobre cambios en el fenotipo de poblaciones de PBMCs permitió establecer que este último en particular, induce cambios morfológicos en las células, lo cual podría asociarse eventualmente con la modulación de la respuesta inmune mediada de forma preferente por un perfil proinflamatorio.

## 5.2 Recomendaciones

Es necesario continuar con los estudios del efecto biológico de los péptidos en el modelo celular de PBMCs y diferenciar cómo varía este en las distintas poblaciones que lo conforman, con el fin de visualizar un panorama más amplio en su mecanismo de acción en un ambiente tan complejo como lo es el sistema inmune y la diversidad de sus respuestas.

Adicionalmente, sería importante establecer el mecanismo de internalización del péptido y su localización subcelular específica, así como la vía de señalización que este puede activar al convertir su señal en una respuesta intracelular, mediante el estudio de algunos componentes particulares en distintas vías de señalización celular.

Teniendo en cuenta el resultado de inducción de citoquinas proinflamatorias tanto a nivel génico como de proteína, sería interesante contrastar en estudios posteriores la regulación en la expresión de estas citoquinas con distintas concentraciones de los péptidos así como en un rango más amplio de tiempos de estímulo.

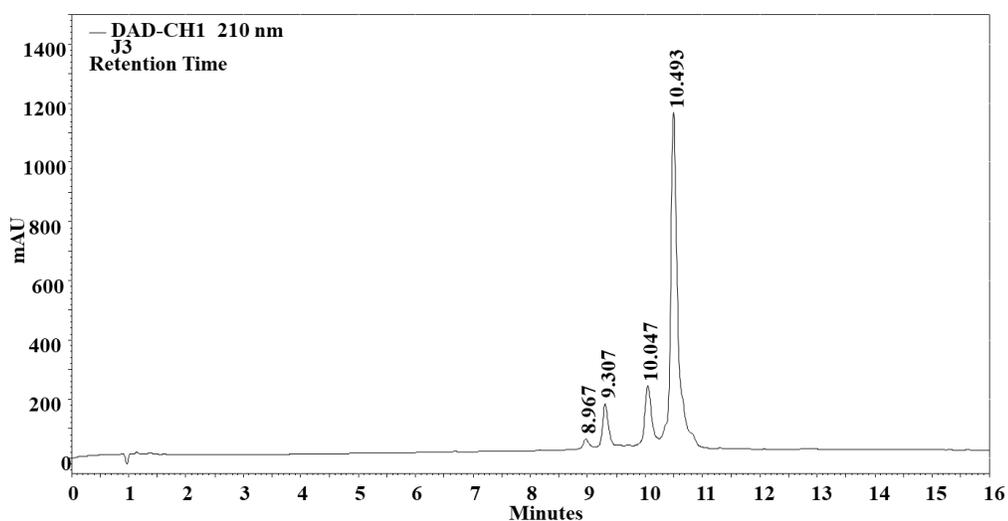
Se requiere continuar con la investigación del efecto de los péptidos en el cambio de fenotipo celular, considerando el papel fundamental que juegan las células dendríticas en la respuesta inmune, y en particular en la activación de los linfocitos T, con el fin de producir una respuesta inmune específica y dirigida hacia el tratamiento de diversas patologías.

Debido a que el modelo celular utilizado (PBMCs) se caracteriza por una alta variabilidad, sería interesante poder realizar más estudios con un número de muestra mayor, que permitan consolidar la significancia estadística de los resultados obtenidos.

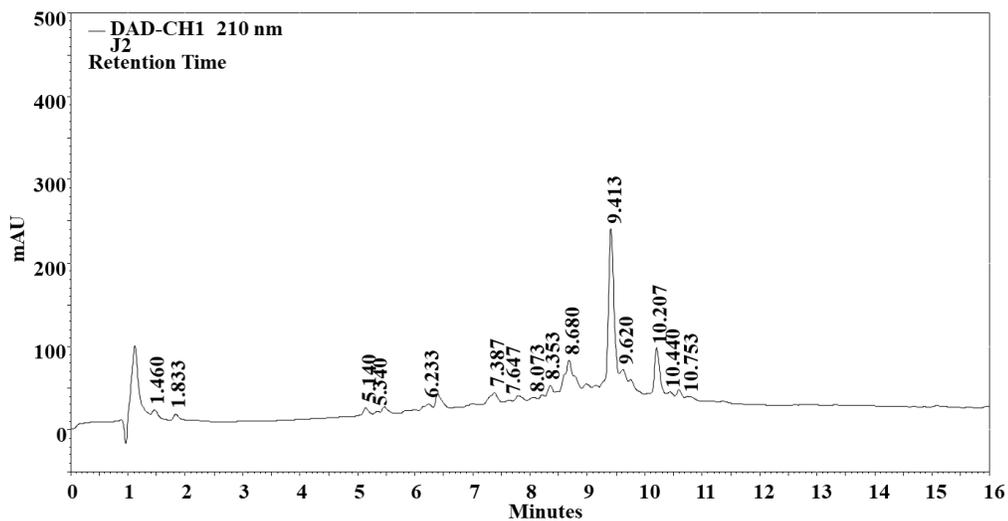


# A. Anexo: Cromatograma péptidos 11438 y 33210

## Péptido 11438



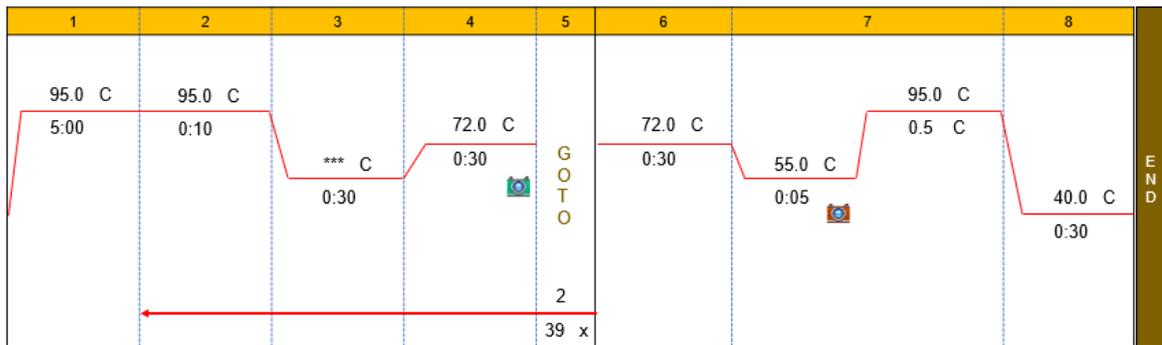
## Péptido 33210



## B. Anexo: Condiciones de trabajo para la determinación de la expresión génica de citoquinas por qPCR

**Tabla A-1** Condiciones de amplificación para los genes de citoquinas.

Gen	Secuencia (5'→3')		Tamaño (pb)	Temperatura anillamiento (°C)	Tamaño amplicón (pb)
<i>IL-4</i>	F	GCACCGAGTTGACCGTAACA	20	58	199
	R	GTAGAACTGCCGGAGCACAG	20		
<i>IL-10</i>	F	GGTTGCCAAGCCTTGTCTGA	20	60	101
	R	AGGGAGTTCACATGCGCCT	19		
<i>IL-12B</i>	F	GACAACCTTTCAAGCAAGGC	20	58	88
	R	AGTGTATGATGGCACTGGTA	20		
<i>GM-CSF</i>	F	CACTGCTGCTGAGATGAATGAAA	23	56	78
	R	GTCTGTAGGCAGGTCGGCTC	20		
<i>TNF-α</i>	F	ATCCTGGGGGACCCAATGTA	20	60	75
	R	AGCCTATTGTTTCAAGCTCCGT	20		
<i>RPS18</i>	F	ATGTGGTGTGAGGAAAGC	19	56	106
	R	TACTGGCGTGGATTCTGC	18		
<i>UQCRC2</i>	F	CCTGCGGGGTGATGTTGATA	20	59	83
	R	CAGCTACTTCCAACGACGA	20		



\*\*\* Temperatura de anillamiento para cada gen

Figura A-1 Programa de amplificación para qPCR.

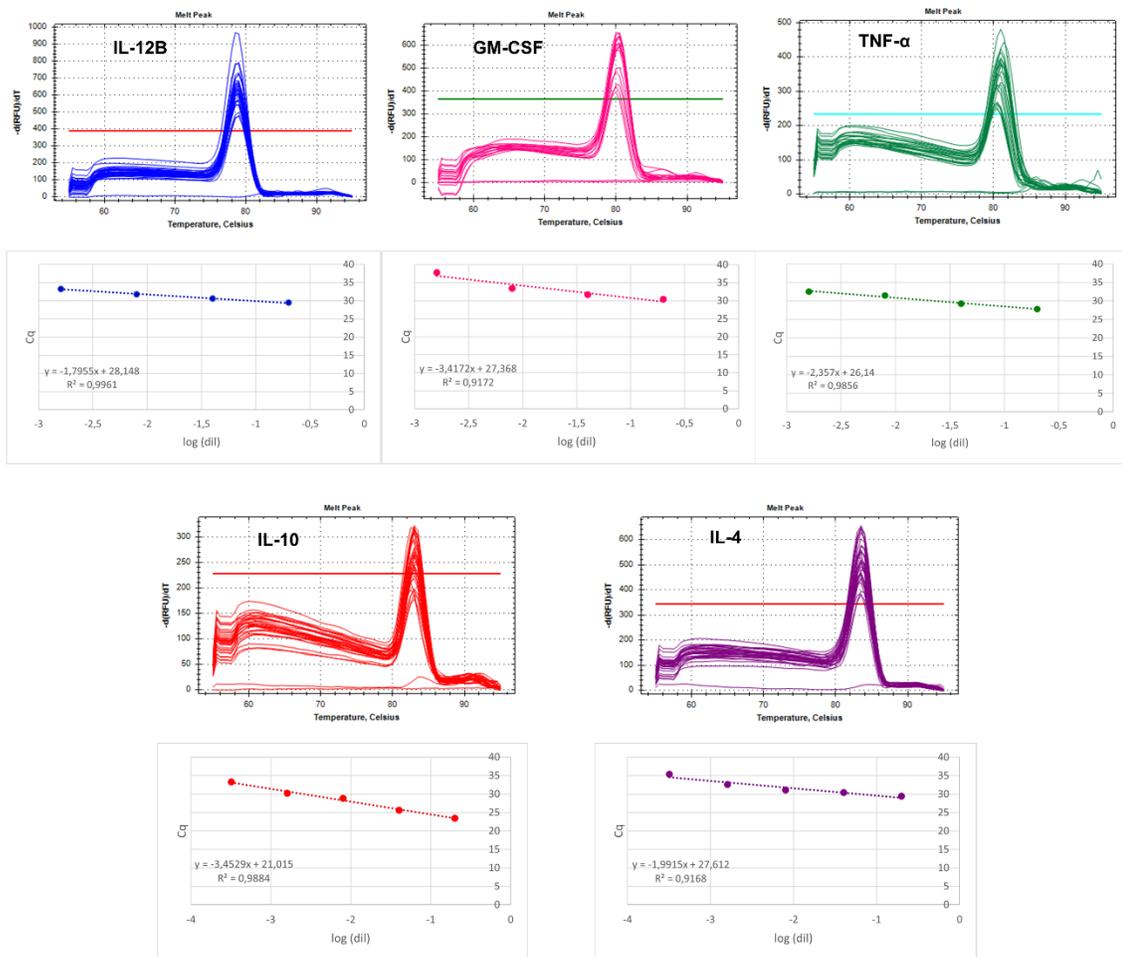
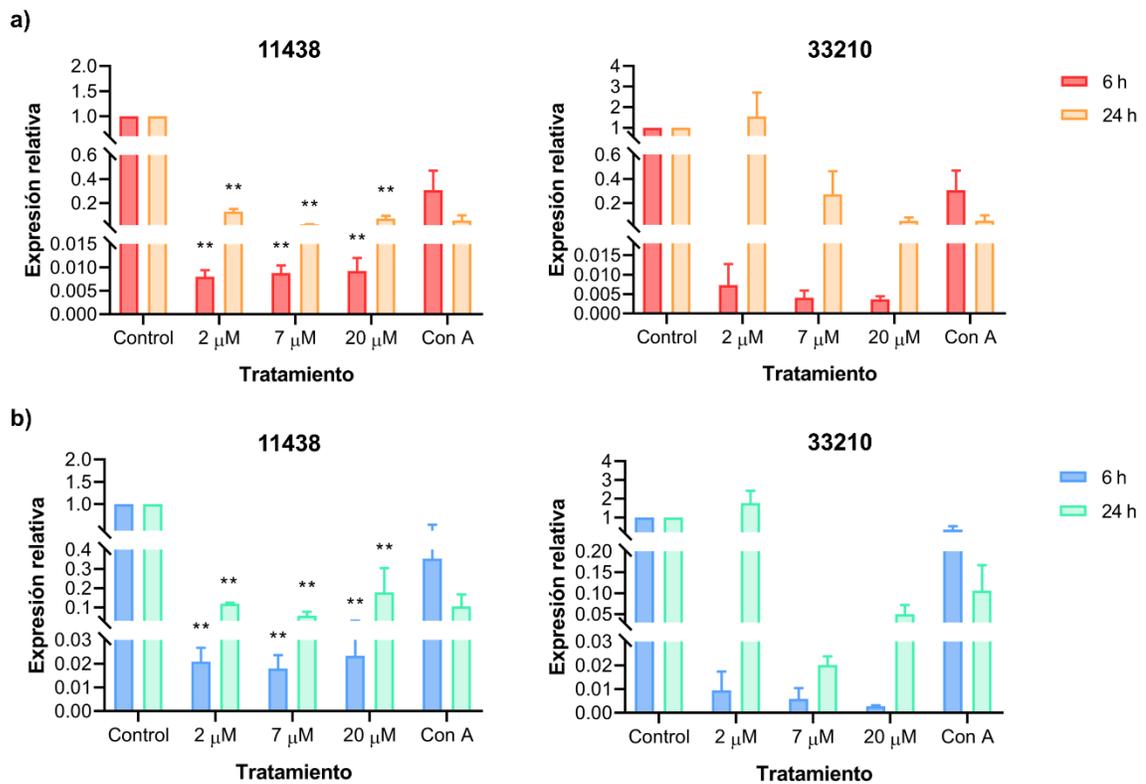


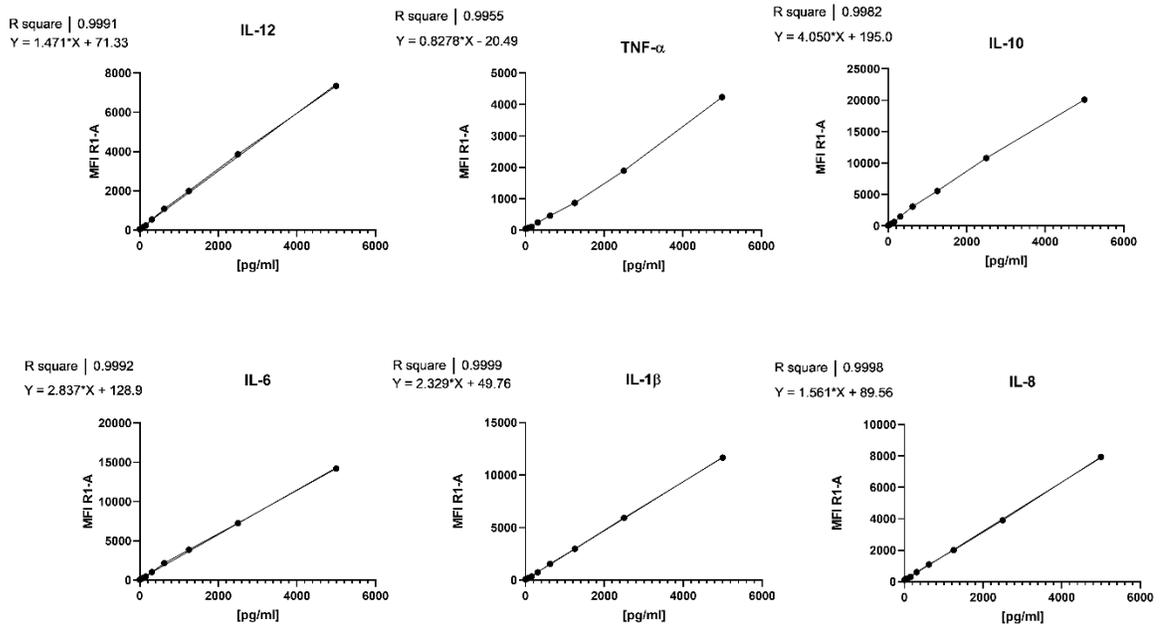
Figura A-2 Verificación de las condiciones de los *primers*. Curvas de *melting* para verificar la presencia de un solo amplicón en cada ensayo, junto con la correspondiente curva de eficiencia de los genes de las citoquinas evaluadas.

## C. Anexo: Expresión génica de GM-CSF e IL-10 en la línea celular U-937



**Figura C-1** Expresión relativa de **a)** GM-CSF y **b)** IL-10 en la línea celular U-937 por efecto de los péptidos 11438 y 33210 durante 6 y 24 horas de tratamiento. Los valores se expresan como relación entre la expresión de los genes de interés y la media geométrica de los genes de referencia RPS18 y UQCRC2. Las barras de error representan el error estándar de la media ( $\pm$ SEM). El análisis por ANOVA de dos vías con post-test de Tukey mostró diferencias estadísticamente significativas (\*\* $p < 0,01$ ) por comparación entre los tratamientos y el control.

## D. Anexo: Curvas de calibración CBA



**Figura D-5-2** Curva de calibración y regresión lineal para las citoquinas IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-8, correspondientes al kit Cytometric Bead Array (CBA).

## E. Anexo: Certificados de presentación en eventos académicos

CLAQ – C2B2 (2020)



Conferencia Virtual Latin X Chem (2021)



## Bibliografía

1. Shaw DM, Merien F, Braakhuis A, Dulson D. T-cells and their cytokine production: The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of strenuous exercise. *Cytokine*. 2018;104(September 2017):136–42.
2. Berraondo P, Sanmamed MF, Ochoa MC, Etxeberria I, Aznar MA, Pérez-Gracia JL, et al. Cytokines in clinical cancer immunotherapy. Vol. 120, *British Journal of Cancer*. 2019. p. 6–15.
3. Young LS, Yap LF, Murray PG. Epstein-Barr virus: More than 50 years old and still providing surprises. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2016;16(12):789–802. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrc.2016.92>
4. Heineman T, Gong M, Sample J, Kieff E. Identification of the Epstein-Barr virus gp85 gene. *J Virol* [Internet]. 1988;62(4):1101–7. Available from: <https://jvi.asm.org/content/62/4/1101.long>
5. Chen J, Rowe CL, Jardetzky TS, Longnecker R. The KGD motif of Epstein-Barr virus gH/gL is bifunctional, orchestrating infection of B cells and epithelial cells. *MBio* [Internet]. 2012;3(1):1–9. Available from: <https://mbio.asm.org/content/3/1/e00290-11.long>
6. Frappier L. Epstein-Barr virus: Current Questions and Challenges. *Tumour Virus Res* [Internet]. 2021;12:200218. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tvr.2021.200218>
7. Edson CM, Thorley-Lawson DA. Synthesis and Processing of the Three Major Envelope Glycoproteins of Epstein-Barr Virus. Vol. 46, *Journal of Virology*. 1983.
8. Borza CM, Hutt-Fletcher LM. Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat Med*. 2002;8(6):594–9.
9. Kirschner AN, Omerović J, Popov B, Longnecker R, Jardetzky TS. Soluble Epstein-Barr Virus glycoproteins gH, gL, and gp42 form a 1:1:1 stable complex that acts like soluble gp42 in B-cell fusion but not in epithelial cell fusion. *J Virol*. 2006;80(19):9444–54.
10. Li Q, Turk SM, Hutt-Fletcher LM. The Epstein-Barr virus (EBV) BZLF2 gene product

- associates with the gH and gL homologs of EBV and carries an epitope critical to infection of B cells but not of epithelial cells. *J Virol.* 1995;69(7):3987–94.
11. Wang X, Kenyon WJ, Li Q, Müllberg J, Hutt-Fletcher LM. Epstein-Barr Virus uses different complexes of glycoproteins gH and gL to infect B lymphocytes and epithelial cells. *J Virol.* 1998;72(7):5552–8.
  12. Chesnokova LS, Ahuja MK, Hutt-Fletcher LM. Epstein-Barr Virus Glycoprotein gB and gHgL can mediate fusion and entry in trans, and heat can act as a partial surrogate for gHgL and trigger a conformational change in gB. *J Virol.* 2014;88(21):12193–201.
  13. Chesnokova LS, Hutt-Fletcher LM. Fusion of Epstein-Barr Virus with epithelial cells can be triggered by  $\alpha\beta 5$  in addition to  $\alpha\beta 6$  and  $\alpha\beta 8$ , and integrin binding triggers a conformational change in glycoproteins gHgL. *J Virol.* 2011;85(24):13214–23.
  14. Urquiza M, Suarez J, Lopez R, Vega E, Patino H, Garcia J, et al. Identifying gp85-regions involved in Epstein-Barr virus binding to B-lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Jun 18;319(1):221–9.
  15. Plata S LM, Oviedo L JF, Rincón Orozco B. Revisión sistemática: estrategias virales para la inducción de cáncer “virus de Epstein-Barr: latencia y mecanismos asociados a la oncogénesis viral.” *Salud UIS.* 2018;50(3):257–68.
  16. Chen J, Sathiyamoorthy K, Zhang X, Schaller S, Perez White BE, Jardetzky TS, et al. Ephrin receptor A2 is a functional entry receptor for Epstein-Barr virus. *Nat Microbiol* [Internet]. 2018;3(2):172–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-017-0081-7>
  17. Zhang H, Li Y, Wang HB, Zhang A, Chen ML, Fang ZX, et al. Ephrin receptor A2 is an epithelial cell receptor for Epstein-Barr virus entry. *Nat Microbiol.* 2018;3(2):164–71.
  18. Borza CM, Morgan AJ, Turk SM, Hutt-Fletcher LM. Use of gHgL for Attachment of Epstein-Barr Virus to Epithelial Cells Compromises Infection. *J Virol.* 2004;78(10):5007–14.
  19. Hutt-Fletcher LM. Epstein-Barr Virus Entry. *J Virol.* 2007;81(15):7825–32.
  20. Masy E, Adriaenssens E, Montpellier C, Crépieux P, Mougél A, Quatannens B, et al. Human Monocytic Cell Lines Transformed In Vitro by Epstein-Barr Virus Display a Type II Latency and LMP-1-Dependent Proliferation. *J Virol.* 2002;76(13):6460–72.
  21. Savard M, Bélanger C, Tardif M, Gourde P, Flamand L, Gosselin J. Infection of

- primary human monocytes by Epstein-Barr Virus. *J Virol.* 2000;74(6):2612–9.
22. Ogembo JG, Kannan L, Ghiran I, Nicholson-Weller A, Finberg R, Tsokos GC, et al. Human complement receptor Type 1/CD35 is an Epstein-Barr Virus receptor. *Cell Rep.* 2013;3(2):1–23.
  23. Torii Y, Kawada J, Murata T, Yoshiyama H, Kimura H, Ito Y. Epstein-Barr virus infection-induced inflammasome activation in human monocytes. *PLoS One.* 2017;1–16.
  24. Saveria M, Montani G, Gonnella R, Vitillo M, Faggioni A, Santarelli R, et al. EBV up-regulates PD-L1 on the surface of primary monocytes by increasing ROS and activating TLR signaling and STAT3. *J Leukoc Biol.* 2018;1–12.
  25. Oda T, Imai S, Chiba S, Takada K. Epstein – Barr Virus Lacking Glycoprotein gp85 Cannot Infect B Cells and Epithelial Cells. 2000;58:52–8.
  26. Möhl BS, Schröter C, Klupp BG, Fuchs W, Mettenleiter TC, Jardetzky TS, et al. Comparative mutagenesis of Pseudorabies virus and Epstein-Barr Virus gH identifies a structural determinant within Domain III of gH required for surface expression and entry function. *J Virol.* 2016;90(5):2285–93.
  27. Guerreiro-Cacais AO, Li LQ, Donati D, Bejarano MT, Morgan A, Masucci MG, et al. Capacity of Epstein-Barr virus to infect monocytes and inhibit their development into dendritic cells is affected by the cell type supporting virus replication. *J Gen Virol.* 2004;85(10):2767–78.
  28. Li LQ, Liu D, Hutt-Fletcher L, Morgan A, Masucci MG, Levitsky V. Epstein-Barr virus inhibits the development of dendritic cells by promoting apoptosis of their monocyte precursors in the presence of granulocyte macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-4. *Blood.* 2002;99(10):3725–34.
  29. Parra López CA, Marchena DA, Urquiza Martínez M, Melo Cárdenas J, Vanegas M, Patarroyo Murillo ME. Abstracts for the 25th Annual Scientific Meeting of the International Society for Biological Therapy of Cancer. In: *Journal of Immunotherapy* [Internet]. 2010. p. 879. Available from: [https://journals.lww.com/immunotherapy-journal/Citation/2010/10000/Abstracts\\_for\\_the\\_25th\\_Annual\\_Scientific\\_Meeting.13.aspx](https://journals.lww.com/immunotherapy-journal/Citation/2010/10000/Abstracts_for_the_25th_Annual_Scientific_Meeting.13.aspx)
  30. Urquiza M, Melo-Cardenas J, Guevara T, Echeverria I, Rodriguez IC, Vanegas M, et al.  $\alpha$ -Helix peptides designed from EBV-gH protein display higher antigenicity and

- induction of monocyte apoptosis than the native peptide. *Amino Acids*. 2010;39(5):1507–19.
31. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología Celular y Molecular*. Octava Edi. Inc E, editor. Barcelona: Saunders; 2015. 537 p.
  32. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma Clin Immunol* [Internet]. 2018;14(s2):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>
  33. Mcdonald DR, Levy O. Innate Immunity. In: *Clinical Immunology* [Internet]. Fifth Edit. Elsevier Ltd; 2019. p. 39-53.e1. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6896-6.00003-X>
  34. Stunnenberg HG, Netea MG, Latz E, Xavier RJ, O'Neill LAJ, Natoli G, et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science* (80-). 2016;352(6284):aaf1098–aaf1098.
  35. Stenken JA, Poschenrieder AJ. Bioanalytical chemistry of cytokines - A review. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2015;853(1):95–115. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2014.10.009>
  36. Schirmer M, Kumar V, Netea MG, Xavier RJ. The causes and consequences of variation in human cytokine production in health. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2018;54:50–8. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L2000858704%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2018.05.012>
  37. Zhang J-M, An J. Cytokines, Inflammation, and Pain. *Int Anesthesiol Clin*. 2007;45(2):27–37.
  38. Seruga B, Zhang H, Bernstein LJ, Tannock IF. Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer. Vol. 8, *Nature Reviews Cancer*. 2008. p. 887–99.
  39. O'Shea JJ, Murray PJ. Cytokine Signaling Modules in Inflammatory Responses. *Immunity*. 2008;28(4):477–87.
  40. Cytokines in the balance [Internet]. Vol. 20, *Nature Immunology*. 2019. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0557-0>
  41. Tisoncik JR, Korth MJ, Simmons CP, Farrar J, Martin TR, Katze MG. Into the Eye of the Cytokine Storm. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2012;76(1):16–32. Available from: <http://mmbbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.05015-11>

42. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* [Internet]. 2000;118(2):503–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1378/chest.118.2.503>
43. Ray A. Cytokines and their Role in Health and Disease: A Brief Overview. *MOJ Immunol.* 2016;4(2):1–9.
44. Shaikh PZ. Cytokines & their physiologic and pharmacologic functions in inflammation. *Int J Pharm Life Sci.* 2011;2(11):1247–63.
45. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. Vol. 1843, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research.* 2014. p. 2563–82.
46. Luo Y, Zheng SG. Hall of fame among pro-inflammatory cytokines: Interleukin-6 gene and its transcriptional regulation mechanisms. *Front Immunol.* 2016;7(DEC):1–7.
47. Spellberg B, Edwards JE. Type 1/type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis.* 2001;32(1):76–102.
48. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* [Internet]. 2000;117(4):1162–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1378/chest.117.4.1162>
49. Wynn TA. Type 2 cytokines: Mechanisms and therapeutic strategies. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2015;15(5):271–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3831>
50. Deo SS, Mistry KJ, Kakade AM, Niphadkar P V. Role played by Th2 type cytokines in IgE mediated allergy and asthma. *Lung India.* 2010;27(2):66–71.
51. Henry EK, Inclan-rico JM, Siracusa MC, State R. Type 2 cytokine responses: regulating immunity to helminth parasites and allergic inflammation. *Curr Pharmacol Reports.* 2017;3(6):346–59.
52. Gocheva V, Wang HW, Gadea BB, Shree T, Hunter KE, Garfall AL, et al. IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev.* 2010;24(3):241–55.
53. Mitra S, Leonard WJ. Biology of IL-2 and its therapeutic modulation: Mechanisms and strategies. *J Leukoc Biol.* 2018;103(4):643–55.
54. Cote-Sierra J, Foucras G, Guo L, Chiodetti L, Young HA, Hu-Li J, et al. Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(11):3880–5.

55. Weaver LK, Behrens EM. Weathering the Storm: Improving Therapeutic Interventions for Cytokine Storm Syndromes by Targeting Disease Pathogenesis. *Curr Treat Options Rheumatol*. 2017;3(1):33–48.
56. Yiu HH, Graham AL, Stengel RF. Dynamics of a Cytokine Storm. *PLoS One*. 2012;7(10).
57. Riddell SR. Adrenaline fuels a cytokine storm during immunotherapy. Vol. 564, *Nature*. 2018.
58. Morris EC, Neelapu SS, Giavridis T, Sadelain M. Cytokine release syndrome and associated neurotoxicity in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2021;0123456789. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-021-00547-6>
59. Kang S, Kishimoto T. Interplay between interleukin-6 signaling and the vascular endothelium in cytokine storms. *Exp Mol Med* [Internet]. 2021;53(7):1116–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s12276-021-00649-0>
60. Yang L, Xie X, Tu Z, Fu J, Xu D, Zhou Y. The signal pathways and treatment of cytokine storm in COVID-19. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2021;6(1):1–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-021-00679-0>
61. Behrens EM, Koretzky GA. Cytokine Storm Syndrome Looking Toward the Precision Medicine Era. *Arthritis Rheumatol*. 2017;69(6):1135–43.
62. Xu HM. Th1 cytokine-based immunotherapy for cancer. Vol. 13, *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International*. Elsevier (Singapore) Pte Ltd; 2014. p. 482–94.
63. Anusha A, Kumar S, Kaushik S, Jyoti A. Cancer immunotherapy. *J Pharm Sci Res*. 2017;9(5):662–6.
64. Conlon KC, Miljkovic MD, Waldmann TA. Cytokines in the Treatment of Cancer. *J Interf Cytokine Res*. 2019;39(1):6–21.
65. Chulpanova DS, Kitaeva K V., Green AR, Rizvanov AA, Solovyeva V V. Molecular Aspects and Future Perspectives of Cytokine-Based Anti-cancer Immunotherapy. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8(June).
66. Briukhovetska D, Dörr J, Endres S, Libby P, Dinarello CA, Kobold S. Interleukins in cancer: from biology to therapy. *Nat Rev Cancer*. 2021;0123456789(Table 1).
67. Qiu Y, Su M, Liu L, Tang Y, Pan Y, Sun J. Clinical Application of Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Drug Des Devel Ther*. 2021;15:2269–87.
68. McFarlane A, Pohler E, Moraga I. Molecular and cellular factors determining the functional pleiotropy of cytokines. *FEBS J*. 2022;

69. Riddy DM, Goy E, Delerive P, Summers RJ, Sexton PM, Langmead CJ. Comparative genotypic and phenotypic analysis of human peripheral blood monocytes and surrogate monocyte-like cell lines commonly used in metabolic disease research. *PLoS One*. 2018;13(5):1–19.
70. ATCC. U-937 (ATCC® CRL-1593.2™) [Internet]. American Type Cell Collection. Available from: <https://www.atcc.org/products/all/CRL-1593.2.aspx>
71. Tang B, Li Z, Huang D, Zheng L, Li Q. Screening of a Specific Peptide Binding to VPAC1 Receptor from a Phage Display Peptide Library. *PLoS One*. 2013;8(1).
72. Invitrogen. Hoechst Stains [Internet]. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2005. p. 9–12. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/H3570#/H3570><https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/H3570#/H3570>
73. Chang H-Y, Huang H-C, Huang T-C, Yang P-C, Wang Y-C, Juan H-F. Flow Cytometric Detection of Mitochondrial Membrane Potential. *Bio-protocol* [Internet]. 2013;3(8):e430. Available from: <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.430>
74. Adrie C, Bachelet M, Vayssier-Taussat M, Russo-Marie F, Bouchaert I, Adib-Conquy M, et al. Mitochondrial membrane potential and apoptosis peripheral blood monocytes in severe human sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(3):389–95.
75. Invitrogen. TRIzol® Reagent User Guide [Internet]. ThermoFisher Scientific. 2020. p. 1–5. Available from: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/trizol\\_reagent.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/trizol_reagent.pdf)
76. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156–9.
77. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012;13(134):1–11.
78. Stothard P. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript Programs for Analyzing and Formatting Protein and DNA Sequences. *Biotechniques*. 2000;28(6):1102–4.
79. Bio-Rad Laboratories I. Real-Time PCR Applications Guide. 1st ed. 2006. 1–100 p.
80. Sánchez-Barinas CD, Vergara-Vanegas V, Gamboa-Hernández CM, Ocampo M, Cuello-Oliveros A, Patarroyo MA, et al. Peptide-pulsed dendritic cells'

- immunomodulating effect regarding *Mycobacterium tuberculosis* growth in macrophages. *Immunobiology*. 2023;228(2).
81. Hajam IA, Dar PA, Appavoo E, Kishore S, Bhanuprakash V, Ganesh K. Bacterial ghosts of *Escherichia coli* drive efficient maturation of bovine monocyte-derived dendritic cells. *PLoS One*. 2015;10(12):1–15.
  82. Ruseska I, Zimmer A. Internalization mechanisms of cell-penetrating peptides. *Beilstein J Nanotechnol*. 2020;11:101–23.
  83. Zaro JL, Vekich JE, Tran T, Shen W-C. Nuclear localization of Cell-Penetrating Peptides is dependent on endocytosis rather than cytosolic delivery in CHO cells. *Mol Pharm* [Internet]. 2009;6(2):337–44. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
  84. Cartier R, Reszka R. Utilization of synthetic peptides containing nuclear localization signals for nonviral gene transfer systems. *Gene Ther*. 2002;9(3):157–67.
  85. Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, Silachev DN, Irina B, Jankauskas SS, et al. Mitochondrial membrane potential. *Anal Biochem*. 2018;552:50–9.
  86. Wen S, Zhu D, Huang P. Targeting cancer cell mitochondria as a therapeutic approach. Vol. 5, *Future Medicinal Chemistry*. Future Science Ltd London, UK ; 2013. p. 53–67.
  87. Cottet-Rousselle C, Ronot X, Leverve X, Mayol JF. Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes. *Cytom Part A*. 2011;79 A(6):405–25.
  88. Özgen Ü, Savaşan S, Buck S, Ravindranath Y. Comparison of DiOC6(3) uptake and annexin V labeling for quantification of apoptosis in leukemia cells and non-malignant T lymphocytes from children. *Commun Clin Cytom*. 2000;42(1):74–8.
  89. Mathur A, Hong Y, Kemp BK, Barrientos AA, Erusalimsky JD. Evaluation of fluorescent dyes for the detection of mitochondrial membrane potential changes in cultured cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2000;46(1):126–38.
  90. Nagy G, Koncz A, Perl A. T Cell Activation-Induced Mitochondrial Hyperpolarization Is Mediated by Ca<sup>2+</sup> - and Redox-Dependent Production of Nitric Oxide . *J Immunol*. 2003;171(10):5188–97.
  91. Marek N, Myśliwska J, Raczyńska K, Trzonkowski P. Membrane potential of CD4<sup>+</sup> T cells is a subset specific feature that depends on the direct cell-to-cell contacts with monocytes. *Hum Immunol*. 2010;71(7):666–75.
  92. Widlansky ME, Wang J, Shenouda SM, Hagen TM, Smith AR, Kizhakekuttu TJ, et

- al. Altered mitochondrial membrane potential, mass, and morphology in the mononuclear cells of humans with type 2 diabetes. *Transl Res* [Internet]. 2010;156(1):15–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2010.04.001>
93. Chen J, Chernatynskaya A V., Li JW, Kimbrell MR, Cassidy RJ, Perry DJ, et al. T cells display mitochondria hyperpolarization in human type 1 diabetes. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-11056-9>
94. Jones AE, Divakaruni AS. Macrophage activation as an archetype of mitochondrial repurposing. *Mol Aspects Med*. 2020;71(1):1–27.
95. Mills EL, Kelly B, O'Neill LAJ. Mitochondria are the powerhouses of immunity. *Nat Immunol* [Internet]. 2017;18(5):488–98. Available from: <https://doi.org/10.1038/ni.3704>
96. Erndt-Marino J, Hahn MS. Membrane potential controls macrophage activation. In: 10th World Biomaterials Congress [Internet]. Montreal: Frontiers in Bioengineering and Biotechnology; 2016. Available from: [https://www.frontiersin.org/10.3389/conf.fbioe.2016.01.00360/event\\_abstract](https://www.frontiersin.org/10.3389/conf.fbioe.2016.01.00360/event_abstract)
97. Gergely P, Niland B, Gonchoroff N, Pullman R, Phillips PE, Perl A. Persistent mitochondrial hyperpolarization, increased reactive oxygen intermediate production, and cytoplasmic alkalization characterize altered IL-10 signaling in patients with systemic lupus erythematosus 1. *J Immunol* [Internet]. 2002;169(2):1092–101. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
98. Stanilova SA, Miteva LD. Dynamics in expression of the IL-12 related cytokine transcripts of IL-12A, IL-12B and IL-23 after stimulation of human PBMC. *Trakia J Sci*. 2008;6(1):7–11.
99. Sun L, He C, Nair L, Yeung J, Egwuagu CE. Interleukin 12 (IL-12) family cytokines: Role in immune pathogenesis and treatment of CNS autoimmune disease. *Cytokine*. 2015;75(2):249–55.
100. Hochrein H, O'Keeffe M, Luft T, Vandenabeele S, Grumont RJ, Maraskovsky E, et al. Interleukin (IL)-4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL-12 production by mouse and human dendritic cells. *J Exp Med*. 2000;192(6):823–33.
101. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, et al. Novel p19 protein

- engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*. 2000;13(5):715–25.
102. Gadani, Sachin P; Cronk J. Interleukin-4: A Cytokine to Remember. *J Immunol*. 2013;189(9):4213–9.
103. Smiley ST, Grusby MJ. Interleukin 4. In: *Encyclopedia of Immunology*. 1998. p. 1451–3.
104. Kriegel MA, Tretter T, Blank N, Schiller M, Gabler C, Winkler S, et al. Interleukin-4 supports interleukin-12-induced proliferation and interferon- $\gamma$  secretion in human activated lymphoblasts and T helper type 1 cells. *Immunology*. 2006;119(1):43–53.
105. Gor DO, Rose NR, Greenspan NS. Th1-Th2: A Procrustean paradigm. *Nat Immunol*. 2003;4(6):503–5.
106. Kaliński P, Smits HH, Schuitemaker JHN, Vieira PL, van Eijk M, de Jong EC, et al. IL-4 Is a Mediator of IL-12p70 Induction by Human Th2 Cells: Reversal of Polarized Th2 Phenotype by Dendritic Cells. *J Immunol*. 2000;165(4):1877–81.
107. Jeannin P, Delneste Y, Life P, Gauchat J -F, Kaiserlian D, Bonnefoy J -Y. Interleukin-12 increases interleukin-4 production by established human Th0 and Th2-like T cell clones. *Eur J Immunol*. 1995;25(8):2247–52.
108. Ngkelo A, Meja K, Yeadon M, Adcock I, Kirkham PA. LPS induced inflammatory responses in human peripheral blood mononuclear cells is mediated through NOX4 and G  $\alpha$  dependent PI-3kinase signalling. *J Inflamm*. 2012;9:2–8.
109. Janský L, Reymanová P, Kopecký J. Dynamics of Cytokine Production in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Stimulated by LPS or Infected by *Borrelia*. *Physiol Res*. 2003;52(5):593–8.
110. Wu Y, Yue B, Liu J. Lipopolysaccharide-induced cytokine expression pattern in peripheral blood mononuclear cells in childhood obesity. *Mol Med Rep*. 2016;14(6):5281–7.
111. Saraiva M, Saraiva M, Vieira P, Vieira P, Vieira P, O'Garra A, et al. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J Exp Med*. 2020;217(1):1–19.
112. Naing A, Papadopoulos KP, Autio KA, Ott PA, Patel MR, Wong DJ, et al. Safety, Antitumor Activity, and Immune Activation of Pegylated Recombinant Human Interleukin-10 (AM0010) in Patients With Advanced Solid Tumors. *J Clin Oncol* [Internet]. 2016 Aug 15;34(29):3562–9. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.68.1106>

113. Lauw FN, Pajkrt D, Hack E, Kurimoto M, Van Deventer S, Van der Poll T. Proinflammatory Effects of IL-10 During Human Endotoxemia. *J Immunol.* 2000;165(5):2783–9.
114. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol* [Internet]. 2015;16(5):448–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.3153>
115. Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol.* 2000;1(6):510–4.
116. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. 2014;6(Kishimoto 1989):1–16.
117. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. Vol. 140, *Cell.* 2010. p. 883–99.
118. Grivennikov SI, Karin M. Inflammatory cytokines in cancer: Tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage. In: *Annals of the Rheumatic Diseases.* 2011.
119. Scott KA, Arnott CH, Robinson SC, Moore RJ, Thompson RG, Marshall JF, et al. TNF- $\alpha$  regulates epithelial expression of MMP-9 and integrin  $\alpha\beta 6$  during tumour promotion. A role for TNF- $\alpha$  in keratinocyte migration? *Oncogene.* 2004;23(41):6954–66.
120. Bigatto V, De Bacco F, Casanova E, Reato G, Lanzetti L, Isella C, et al. TNF- $\alpha$  promotes invasive growth through the MET signaling pathway. *Mol Oncol.* 2015;9(2):377–88.
121. Mrozek-Gorska P, Buschle A, Pich D, Schwarzmayr T, Fechtner R, Scialdone A, et al. Epstein–Barr virus reprograms human B lymphocytes immediately in the prelatent phase of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(32):16046–55.
122. Moro-García MA, Mayo JC, Sainz RM, Alonso-Arias R. Influence of inflammation in the process of T lymphocyte differentiation: Proliferative, metabolic, and oxidative changes. *Front Immunol.* 2018;9(MAR).
123. Silva-Filho JL, Caruso-Neves C, Pinheiro AAS. IL-4: An important cytokine in determining the fate of T cells. *Biophys Rev.* 2014;6(1):111–8.
124. Hamza T, Barnett JB, Li B. Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications. *Int J Mol Sci.* 2010;11(3):789–806.
125. Hashimoto M, Im SJ, Araki K, Ahmed R. Cytokine-mediated regulation of CD8 T-cell

- responses during acute and chronic viral infection. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2019;11(1):1–17.
126. Yi H-J, Lu G-X. Adherent and non-adherent dendritic cells are equivalently qualified in GM-CSF, IL-4 and TNF- $\alpha$  culture system. *Cell Immunol.* 2012;277(1–2):44–8.
127. O’Keeffe M, Mok WH, Radford KJ. Human dendritic cell subsets and function in health and disease. *Cell Mol Life Sci [Internet].* 2015;72(22):4309–25. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2005-0>
128. Blanco P, Palucka AK, Pascual V, Banchereau J. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev [Internet].* 2008;19(1):41–52. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
129. Patente TA, Pinho MP, Oliveira AA, Evangelista GCM, Bergami-Santos PC, Barbuto JAM. Human dendritic cells: Their heterogeneity and clinical application potential in cancer immunotherapy. *Front Immunol.* 2019;10(JAN):1–18.
130. Kuhn S, Yang J, Ronchese F. Monocyte-derived dendritic cells are essential for CD8+ T cell activation and antitumor responses after local immunotherapy. *Front Immunol.* 2015;6(NOV):1–14.
131. Stephens TA, Nikoopour E, Rider BJ, Leon-ponte M, Chau TA, Chaturvedi P, et al. Dendritic cell differentiation induced by a self-peptide derived from Apolipoprotein E. *jo.* 2008;181(10):6859–71.