

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA PROTEÍNA GP63 SOBRE LINFOCITOS B
HUMANOS (RAMOS RA-1) Y CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE
PERIFÉRICA**

MARÍA CLAUDIA BARRERA FLAQUER

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
SANTIAGO DE CALI
2025**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA PROTEÍNA GP63 SOBRE LINFOCITOS B
HUMANOS (RAMOS RA-1) Y CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE
PERIFÉRICA**

MARÍA CLAUDIA BARRERA FLAQUER

Tesis doctoral presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Biomédicas.

DIRECTORA: ANILZA BONELO PERDOMO BSc, MSc, PhD.

CO-DIRECTOR: ANDRES FELIPE ZEA VERA MD, PhD.

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
SANTIAGO DE CALI
2025**

AGRADECIMIENTOS

¡Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a quienes han sido parte esencial de este camino!

En primer lugar, a mis tutores, por su guía, paciencia y exigencia académica, que no solo enriquecieron mi formación científica, sino que también me motivaron a superar mis propios límites. Al Dr. Gabriel Jaime Tobón, gracias por no abandonar el barco, por estar pendiente y apoyarme siempre durante todo este tiempo, por creer en mi idea y por todas las oportunidades que me dio a nivel profesional. A la profesora Anilza Bonelo, por recibirme cuando nadie más lo hizo, por su guía y paciencia conmigo. Gracias también por permitirme conocer de la docencia y darme la oportunidad de enseñar bien y con calidad. Al Dr. Andrés Zea, mil gracias por toda tu ayuda, por hacer posible esta tesis, por conseguir estos resultados, y por todo el conocimiento adquirido en mi tiempo en EE. UU., gracias por recibirme en tu casa, ayudarme y dar todo de ti en este proyecto.

A todo el equipo de investigación y laboratorios del “*Genetic Immunotherapy Section (GIS)*” que hace parte del *Laboratory of Clinical Immunology and Microbiology (LCIM)* del NIH, en especial a Alex Cho y Suk See de Ravin, por su apoyo constante, por compartir conmigo y por hacer del día a día un ambiente de trabajo creativo y estimulante. Al Dr. Harry Malech gracias por darme esta oportunidad tan grande de ir a su laboratorio y de aprender muchísimo, pero sobre todo contribuir financieramente en este proyecto. Finalmente, mi sentimiento de gratitud con el Dr. Uimook Choi, quien me llevó a mis límites dejándome ver todo lo que podía dar como investigadora y como persona, gracias por su paciencia y por todo lo que me enseñó.

También quiero agradecer a la profesora Rafaela Salgado Ferreira de la *Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)* por toda su guía durante mi pasantía en Brasil, la corrección de los análisis *in silico* fue clave para dar paso a la dinámica

molecular desarrollada en apoyo con Sergio Hassan del NIH, que nos apoyó de forma desinteresada y con una voluntad y diligencia excepcional.

A mis profesores, por sembrar en mí la curiosidad y el rigor que fundamentan toda investigación, y por ser referentes de dedicación y compromiso con la ciencia. En especial agradecimiento a la profesora Liliana Salazar, cuya empatía y palabras fueron la terapia necesaria para continuar y no desfallecer. De igual forma, quiero agradecer a la Universidad del Valle con su programa de Asistentes Docentes, que me permitió sostenimiento y fortalecer mis capacidades en la docencia durante mi postgrado.

Doy infinitas gracias a mi familia, por su amor incondicional, por creer en mí incluso en los momentos más difíciles y por brindarme el soporte emocional que hizo posible cada paso de este proyecto. Por supuesto, a mi madre Ercilia, quien siempre ha creído en mí, quien me ayudó en cada segundo y fue mi sostén cuando todo parecía caerse, te amo madre. A mi tía Gaby por siempre estar pendiente y a mi madrina Perla por todas sus oraciones. A mi querida Tefa, mil gracias por toda tu paciencia, por estar ahí a pesar de las adversidades, por darme mi tiempo y espacio para llevar esto a cabo; por seguirme la corriente siempre y por reír juntas, ILY.

Por último, a mis amigos queridos por su compañía, su aliento y por recordarme la importancia de celebrar cada pequeño logro. Iván, Daniela, Isabel, Angela, Nana, María Elena, Maritza, Dra. Diana y Dra. Luz A. A todos ustedes, gracias por acompañarme en esta etapa y por dejar una huella imborrable en mi vida personal y profesional.

☺ At least better than Hula!

Con cariño Maria Claudia Barrera Flaquer.

TABLA DE CONTENIDO

1.0 INTRODUCCIÓN.....	17
2.0 MARCO TEÓRICO GENERAL.....	21
2.1 Metaloproteasa GP63 / Leishmanolysin.....	21
2.2 Centro activo y coordinación del Zinc.....	21
2.3 Mecanismo de corte o clivaje proteolítico.....	24
3.0 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo General	30
3.2 Objetivo Específicos.....	30
4.0 DISEÑO METODOLÓGICO	32
4.1 Diseño del estudio.....	32
4.2 Población de estudio y Consideraciones Éticas.....	33
4.3 Manejo de datos estadísticos	34
5.0 CAPÍTULO 1.....	39
5.1 MARCO TEÓRICO.....	39
5.1.1 Docking molecular.....	39
5.1.2 Dinámica molecular.....	40
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS	41
5.2.1 Identificación bioinformática de GP63 y proteínas diana.....	41
5.2.2 Análisis de Docking Molecular	42
5.2.3 Análisis de Dinámica molecular.....	43
5.3 RESULTADOS CAPÍTULO 1.....	46
5.3.1 Análisis computacional de la interacción de GP63 con proteínas de la activación de linfocitos B humanos.	46
5.4 DISCUSIÓN CAPÍTULO 1.....	55
5.5 Resumen de los hallazgos:	60

6.0 CAPÍTULO 2.....	61
6.1 MARCO TEÓRICO	61
6.1.1 Producción de proteínas recombinantes	61
6.1.2 Células CHO y Células HEK	61
6.1.3 Células primarias y su susceptibilidad a transfección/transducción ...	62
6.1.4 Terapia génica con lentivirus.....	64
6.1.5 Tipos de lentivirus y pseudotificado.....	64
6.2 MATERIALES Y MÉTODOS	67
6.2.1 Cultivo de líneas celulares humanas.....	67
6.2.2 Producción de la proteína GP63 recombinante.....	69
6.2.3 Producción de la proteína en GP63 en células HEK293T ATCC® CRL-11268™	71
6.2.4 Sistema de expresión constitutiva de la proteína GP63.....	75
6.3 RESULTADOS CAPÍTULO 2.0	77
6.3.1 Producción de la proteína recombinante GP63 WT/mt	77
6.3.2 Producción del lentivirus LV-MND-GP63 WT/mt.....	89
6.4 DISCUSIÓN CAPÍTULO 2.....	91
6.5 Resumen de Hallazgos:	95
7.0 CAPÍTULO 3.....	96
7.1 MARCO TEÓRICO	96
7.1.1 Activación de los Linfocitos B (LB)	96
7.2 MATERIALES Y MÉTODOS	106
7.2.1 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (MNSP)	106
7.2.2 Exposición de LB Ramos y MNSP a la proteína GP63 recombinante	106
7.2.3 Análisis de viabilidad.....	107

7.2.4 Determinación de proliferación.....	108
7.2.5 Cuantificación de marcadores celulares y citoquinas intracelulares por citometría de flujo.....	109
7.2.6 Ensayos de cuantificación molecular	112
7.2.7 Activación de LB Ramos <i>in vitro</i>	113
7.2.8 Transducción de LB Ramos y MNSP con LV-MND-GP63 y LV-MND-GFP.....	114
7.2.9 Extracción de DNA y PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) para cuantificación del número de copias del vector por célula o (Vector copy number VCN)	114
7.3 RESULTADOS CAPÍTULO 3.....	116
7.3.1 Efecto de la proteína recombinante GP63 WT/mt sobre LB Ramos y MNSP humanos	116
7.3.2 Transducción de Linfocitos B Ramos y MNSP con el lentivirus (LV-MND-GP63) Parte 1	131
7.3.3 Transducción de LB Ramos y MNSP humanos con lentivirus (LV-MND-GP63) Parte 2.....	154
7.4 DISCUSIÓN CAPÍTULO 3.....	177
7.5 Resumen de los hallazgos:	191
8.0 CONCLUSIONES GENERALES.....	192
9.0 LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS	193
10. BIBLIOGRAFIA	194
11. ANEXOS.....	215

TABLA DE FIGURAS

Figura 1 Estructura de la proteína y el centro activo de GP63.....	23
Figura 2 Descripción del efecto proteolítico de GP63.....	25
Figura 3 Estrategia experimental objetivo 1.0	36
Figura 4 Estrategia experimental objetivo 2.0	37
Figura 5 Estrategia experimental objetivo 3.....	38
Figura 6 Docking molecular de la interacción entre GP63 y Syk.	49
Figura 7 PDBSum análisis del modelo 5.1 interfase GP63:Syk.....	50
Figura 8 Representación del complejo GP63:Syk nativa (WT) y mutante (mt).	53
Figura 9 Interacciones polares y no polares complejo GP63:Syk	54
Figura 10 Partes de un lentivirus	65
Figura 11 Generaciones y genes de un lentivirus	66
Figura 12 SDS-PAGE y Western Blot: Limitaciones técnicas en células CHO.	79
Figura 13 Representación construcción del plásmido para expresión de GP63.	82
Figura 14 Transfección de las líneas celulares THP-1, LT Jurkat y LB Ramos.	84
Figura 15 Las células HEK293T producen GP63 recombinante (48h).	87
Figura 16 La concentración de GP63 recombinante.....	88
Figura 17 La viabilidad de los LB disminuye de forma dosis dependiente	118
Figura 18 La proliferación de los LB disminuye con la exposición a GP63.....	119
Figura 19 Marcadores celulares de LB Ramos modulados	122
Figura 20 Cinética de expresión de marcadores en MNSP	123
Figura 21 Concentración de TNF e IgM en LB Ramos y MNSP	125
Figura 22 Perfil de activación LB Ramos estimulados con LPS,PMA,CpG	128
Figura 23 Detección de TNF en linfocitos B Ramos activados	129
Figura 24 Detección de TNF e IL-10 intracelular en LB Ramos activados.....	130
Figura 25 La viabilidad celular de los LB Ramos disminuye por efecto del LV.	133
Figura 26 Clasificación de tipo de muerte celular en LB Ramos transducidos.. ...	135
Figura 27 Evaluación morfológica de cultivos de LB Ramos transducidos.	136
Figura 28 Comparación del VCN en los LB Ramos transducidos.....	138

Figura 29 Porcentaje de GFP en LB Ramos transducidos	140
Figura 30 Microscopia de luz y fluorescencia LB Ramos transducidos GFP+.....	141
Figura 31 La proliferación-viabilidad de los LB Ramos disminuye MOI-dependiente	143
Figura 32 Microscopia LB Ramos transducidos: la proliferación y muerte celular son MOI-dependiente.	144
Figura 33 (VCN) de LB Ramos transducidos mostró una integración proporcional al MOI.	146
Figura 34 Concentración de IgM en LB Ramos transducidos	147
Figura 35 Expresión de marcadores extracelulares en LB Ramos transducidos ..	149
Figura 36 Expresión de marcadores intracelulares en LB Ramos transducidos ..	152
Figura 37 Muerte celular por apoptosis de los LB Ramos transducidos..	155
Figura 38 Cuantificación de la expresión intracelular de GP63 en Linfocitos B Ramos transducidos.....	157
Figura 39 Análisis de correlación entre GP63 y la viabilidad celular de LB Ramos transducidos.....	158
Figura 40 Expresión día 3 de marcadores de superficie en LB Ramos transducidos a un MOI de 0.5	160
Figura 41 Expresión día 7 de marcadores de superficie en LB Ramos transducidos a un MOI de 0.5..	161
Figura 42 Expresión de CD11b MOI dependiente por modulación intracelular de GP63.....	162
Figura 43 GP63 promueve un fenotipo no convencional	167
Figura 44 La proteína GP63 inhibe la secreción de IgM y la producción de TNF en LB Ramos transducidos sin restauración con la activación clásica.	168
Figura 45 GP63 altera la distribución de subpoblaciones en MNSP.....	171
Figura 46 Los MNSP transducidos GFP+ no presentan alteraciones en la distribución de subpoblaciones ni en la viabilidad celular.	172
Figura 47 MNSP transducidos presentan producción sostenida de TNF.....	173

Figura 48 Modulación diferencial de CD38 y HLA-DR en subpoblaciones celulares de MNSP transducidos	175
Figura 49 GFP no induce una reprogramación de marcadores de activación inmune en MNSP.	176
Figura 50 Docking molecular entre GP63 vs CXCL10.	222
Figura 51 Docking molecular entre GP63 vs CXCL10 con restricciones en Cluspro.	223
Figura 52 Docking molecular entre GP63 vs CXCL10 con restricciones en Haddock.	224
Figura 53 Docking molecular entre GP63 vs CXCL10 con restricciones y adición del Zinc, en Haddock.	225
Figura 54 Porcentaje de transfección de LB Ramos utilizando AMAXA 'Kit V' Programa W-001.....	233
Figura 55 Análisis de enriquecimiento funcional por GP63 en LB.	238

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1 Colección de moléculas hidrolizadas por GP63.....	26
Tabla 2 Secuencias PDB de cristales analizados	45
Tabla 3 Resultados de puntajes y energías.....	47
Tabla 4 Sistemas de Expresión de Proteínas Recombinantes	63
Tabla 5 Plásmidos para la expresión de GP63 (Addgene)	70
Tabla 6 Resumen de la descripción funcional de las moléculas	103
Tabla 7 Anticuerpos para la detección de marcadores por citometría de flujo.....	111
Tabla 8 Ensayos inmuno enzimáticos ELISA para cuantificación.....	113

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO 1 Análisis de secuencias de GP63 en las diferentes especies de Leishmania reportadas en la base de datos TryptripBD.....	215
ANEXO 2 Listado de proteínas de la señalización de los Linfocitos B.....	220
ANEXO 3 Resultados del proceso de estandarización del docking molecular entre GP63 y el control CXCL10.....	221
ANEXO 4 Secuenciación del plásmido de Addgene D5_Ld_280600.....	226
ANEXO 5 Transfección de LB Ramos con plásmido pHL20MND gp63 WT utilizando AMAXA 'Kit V' Programa W-001.....	227
ANEXO 6 Protocolo: Transfección transitoria de HEK293T (ATCC® CRL-11268™) con PEI 25 kDa para expresión de proteína recombinante GP63.....	228
ANEXO 7 Protocolo: Transducción de linfocitos B Ramos y MN5P humanos con lentivirus codificante para GP63.....	234
ANEXO 8 Análisis exploratorio de enriquecimiento funcional de las proteínas moduladas por GP63 en los Linfocitos B Ramos.....	238
ANEXO 9 Certificado de Asistencia al curso: "Workshop "Animal Cell Technology: development and production of biotherapeutics".....	239
ANEXO 10 Certificado de Beca para Asistencia a pasantía internacional: Fellowship program United Nations University Biotechnology for Latin America and The Caribbean (UNU-BIOLAC).....	241
ANEXO 11 Certificado de beca para la asistencia a pasantía internacional: Predoctoral Supplemental Visiting Fellow Award.....	242
ANEXO 12 Listado de participación en publicaciones durante el periodo académico de estudio doctoral.....	244

ABREVIATURAS

AAV: Virus Adeno asociados / (Adeno-associated Virus)
ATCC: Colección Americana de Cultivos / (American Type Culture Collection)
BCR: Receptor del linfocito B/ B cell receptor
BaEV: Virus endógeno de babuinos / (Baboon endogenous virus)
BLK: Quinasa del linfocito B / (B-cell lymphocyte kinase)
CMV: Citomegalovirus / (Cytomegalovirus)
DNA: Ácido Desoxirribonucleico / (Deoxyribonucleic acid)
IFN: Interferón / (Interferon)
LB: Linfocitos B / (Lymphocyte B)
LPS: Lipopolisacárido
LT: Linfocitos T / (Lymphocyte T)
LV: Lentivirus / (Lentivirus)
MND: Myeloproliferative sarcoma virus enhancer, negative control region deleted
MAPK: Proteína quinasa mitógeno activada / (Mitogen-activated protein kinases)
MD: Dinámica Molecular / (Molecular Dynamics)
MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad / (Major Histocompatibility complex)
MOI: Multiplicidad de la infección / (Multiplicity of infection)
NFkB: Factor nuclear de las cadenas kappa B / (Nuclear Factor kappa B)
SYK: Tirosina quinasa del bazo / (Spleen tyrosine kinase)
TCR: Receptor del linfocito T / (Lymphocyte T Receptor)
TNF: Factor de necrosis tumoral / Tumoral necrosis factor
VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana / (Human Immunodeficiency Virus)
VSV-G: Proteína G del virus de la estomatitis vesicular / (Vesicular stomatitis virus G protein)

PALABRAS CLAVE

Glicoproteína GP63, Linfocitos B, Señalización Celular, Inmunomodulación, Apoptosis, Proliferación Celular, Viabilidad Celular, Dinámica Molecular, Proteínas Recombinantes, Lentivirus, Terapias Innovadoras.

Glycoprotein GP63, B-lymphocytes, Cell signaling, Immunomodulation, Apoptosis, Cell Proliferation, Cell Survival, Molecular Dynamics, Recombinant Proteins, Lentivirus, Innovative Therapies.

RESUMEN

La proteína GP63 es una metaloproteasa presente en la membrana de parásitos del género *Leishmania spp.*, que le permite evadir la respuesta inmune del hospedero. Esta proteína modula diversas moléculas del sistema inmune, incluyendo el C3b del complemento, el correceptor CD4 en linfocitos T, mTOR, caspasas, algunas MAPK quinasas y factores de transcripción como NFκB. Su capacidad para modular múltiples rutas inmunológicas fue lo que permitió considerarla una posible herramienta para modular blancos inmunológicos relevantes en linfocitos B (LB).

Inspirados por los avances recientes en el desarrollo de proteínas recombinantes y la transferencia dirigida de proteínas o material genético con fines terapéuticos; se desarrolló un sistema de expresión constitutiva de la proteína GP63 y la producción de la proteína recombinante. Estos modelos, permitieron evaluar los efectos de GP63 en la supervivencia, proliferación, activación y diferenciación de LB humanos. Observamos que la exposición a GP63 recombinante, inducía la expresión de CD38, mientras que su expresión intracelular generaba el aumento de CD11b. En conjunto, estos cambios sugieren que la vía de dosificación de la proteína tiene un impacto en el fenotipo del LB, en especial hacia un perfil más regulador que activador.

Mediante esta aproximación biotecnológica, buscamos aportar evidencia crítica sobre la aplicación de este tipo de proteínas como agentes terapéuticos. El enfoque de este trabajo es innovador, ya que se aleja del paradigma tradicional que considera a GP63 exclusivamente como un factor de virulencia o un blanco terapéutico, proponiendo en cambio su aprovechamiento como una molécula inmunomoduladora, con potencial bioactivo, en contextos terapéuticos que puedan ser aplicados en el futuro, para el tratamiento de enfermedades inmunomediadas.

ABSTRACT

The GP63 protein is a metalloprotease present in the membrane of parasites of the genus *Leishmania spp.*, which enables them to evade the host's immune response. This protein modulates various molecules of the immune system, including complement component C3b, the CD4 receptor on T lymphocytes, mTOR, caspases, certain MAPK kinases, and transcription factors such as NFκB. Its ability to modulate multiple immunological pathways was the key feature that motivated its study in this thesis, considering it as a potential tool to modulate relevant immunological targets in B lymphocytes (BL).

Inspired by recent advances in the development of recombinant proteins and the targeted delivery of proteins or genetic material for therapeutic purposes, we developed a constitutive expression system for the GP63 protein and produced the recombinant protein. These models allowed us to evaluate the effects of GP63 on the survival, proliferation, activation, and differentiation of human B lymphocytes. We observed that exogenous exposure to GP63 induced CD38 expression, whereas its intracellular expression led to an increase in CD11b. Taken together, these changes suggest that the protein delivery route influences the B cell phenotype, particularly shifting it towards a more regulatory rather than an activating profile.

Through this biotechnological approach, we aim to provide critical evidence for the application of such proteins as therapeutic agents. This work takes an innovative approach by moving away from the traditional paradigm that considers GP63 solely as a virulence factor or therapeutic target and instead proposes its use as an immunomodulatory molecule with potential bioactivity in therapeutic contexts that could be applied in the future for the treatment of immune-mediated diseases.

1.0 INTRODUCCIÓN

Los linfocitos B (LB) desempeñan un papel fundamental en las enfermedades inmunomediadas, no solo mediante la producción de anticuerpos, sino también actuando como células presentadoras de antígeno, altamente eficientes y moduladoras de la respuesta inmune (1,2). Estas células pueden participar de la activación de otras células, al captar antígenos, presentarlos a los linfocitos T CD4⁺ y secretar citoquinas proinflamatorias (3,4). Adicionalmente, existen subpoblaciones de linfocitos B, algunos con características reguladoras como los LB (Bregs) que, mediante la producción de IL-10, TGF- β o IL-35, desempeñan funciones antiinflamatorias esenciales, inhibiendo la diferenciación de linfocitos T (LT) Th1/Th17 e induciendo LT reguladores (5,6). Esto apoya la importancia de estudiar estas células que influyen de manera decisiva en la magnitud, calidad y duración de la respuesta inmune, en especial la adaptativa; planteando su potencial como blanco terapéutico en enfermedades autoinmunes, autoinflamatorias e incluso en el cáncer (7–9).

Estas patologías, caracterizadas por una respuesta inmune aberrante, inhibida o exacerbada, y en algunos casos dirigida contra antígenos y tejidos propios, representan un desafío significativo de la medicina contemporánea, constituyendo una de las principales causas de morbilidad crónica y mortalidad a nivel mundial (10,11). A pesar de los avances en el desarrollo de terapias biológicas e inmunosupresoras, el tratamiento actual de estas enfermedades sigue siendo limitado por efectos secundarios significativos, respuestas terapéuticas variables y la necesidad de terapias de por vida, que no abordan las causas subyacentes de la desregulación inmune (12,13).

En la búsqueda de nuevas formas de modular la función de los LB, estudiamos a GP63 (glicoproteína de 63 kDa), una metaloproteasa de zinc expresada abundantemente en la superficie de los parásitos del género *Leishmania spp* (14).

Esta proteína ha demostrado poseer propiedades inmunomoduladoras, siendo capaz de interferir con múltiples vías de señalización inmune y promover respuestas antiinflamatorias que facilitan la supervivencia del parásito en las células hospederas (15–17).

La capacidad inmunomoduladora de GP63 se fundamenta en su arquitectura molecular única, que incluye un dominio catalítico altamente conservado, un metal como el zinc, y regiones específicas que determinan la especificidad de sustrato. Esta estructura le confiere la capacidad de interactuar selectivamente con componentes clave del sistema inmune, modulando respuestas tanto a nivel celular como molecular (18,19).

El presente trabajo doctoral propone un enfoque novedoso, el uso de la proteasa GP63 como agente modulador en un contexto diferente, independiente del parásito del cual se deriva naturalmente. Esta aproximación representa una innovación conceptual y metodológica, ya que los estudios previos sobre GP63, se han limitado exclusivamente al contexto de la infección parasitaria, donde la proteína actúa como parte integral del ciclo de vida del patógeno (20).

La novedad fundamental de esta investigación radica en el aislamiento y caracterización de GP63 como entidad terapéutica, liberada de su contexto original y evaluada específicamente por sus propiedades inmunomoduladoras intrínsecas. Esta aproximación permite explorar el potencial de la proteína, sin efectos ambiguos y los riesgos asociados con la presencia del parásito completo, abriendo un nuevo campo de investigación usando modulación basada en factores derivados de patógenos.

Para evaluar el efecto de la proteína GP63 sobre los LB, empleamos dos abordajes complementarios: la dosificación exógena, mediante la proteína recombinante producida en nuestro laboratorio y la expresión intracelular a través de un sistema

lentiviral. Esta estrategia se alinea con las tendencias actuales en el desarrollo de terapias avanzadas e incluso la terapia génica, que incluyen el uso de vectores virales, como los lentivirus, y plataformas que van dirigidas a modular de forma precisa y específica la respuesta inmune como las células CAR-T (21,22).

Con todos los desafíos que presentan los tratamientos convencionales y a pesar de los avances significativos en el manejo de los síntomas, la inmunosupresión prolongada y la falta de tratamientos curativos, se hace evidente la necesidad de nuevas estrategias, que no solo mejoren la eficacia y seguridad, sino que también ofrezcan un enfoque más preciso y duradero para el manejo de enfermedades inmunomediadas (23,24).

Particularmente, en las enfermedades autoinmunes (EA), que son entidades multifactoriales y poligénicas, se han empezado a desarrollar tratamientos con estas nuevas tecnologías. Recientes reportes en modelos murinos (MRL-lpr mice), de Lupus Eritematoso Sistémico (LES), describen tratamientos con vectores lentivirales de tipo anti-CD19 CAR-T; en los que se evidenció que el tratamiento, redujo eficazmente el número de LB *in vivo* de forma persistente, aumentó la supervivencia de los animales y mejoró los síntomas de la EA y retrasó el progreso de la patogénesis (25). Este tratamiento se ha probado en casos extremos de pacientes con fenotipos de recaída recurrente y refractariedad a las terapias convencionales. Estos pacientes alcanzaron la remisión y disminución de la actividad de la enfermedad, depleción en los LB auto reactivos, menor proteinuria y bajos niveles de factores solubles, normalización de C3 del complemento; también reducción de los anticuerpos anti-dsDNA y la sensación de fatiga (26). Esto representó un gran avance en la terapéutica y, sobre todo, fueron reportadas como seguras, no tóxicas y con resultados a largo plazo (27–29).

También en otros abordajes de carácter no sistémico, sino localizado, es decir, con daño tisular órgano específico, se ha buscado implementar estas terapias con el fin

de mejorar el estado clínico de los pacientes, como se observó en unos casos con Artritis Reumatoide (AR) grave, tratados con vectores asociados de Adenovirus (AAV), como antagonistas del receptor de la IL-1 (IL-1R) (30). En particular, estos estudios en modelos animales y ensayos preliminares en humanos han demostrado que estos enfoques pueden restaurar el equilibrio inmunológico y revertir de manera eficaz esos fenotipos y con menores riesgos a largo plazo (31,32) .

Estas nuevas estrategias han demostrado, precisión en la modulación del sistema inmune, durabilidad de la respuesta terapéutica, reducción de efectos secundarios y posibilidad de cura (26,33) . Aunque el desarrollo y la implementación puedan tener un alto costo inicial, los beneficios a largo plazo en términos de reducción de hospitalizaciones, disminución de la dependencia de terapias inmunosupresoras crónicas y mejora de la calidad de vida de los pacientes, podrían generar un impacto económico positivo (34,35).

Basados en estos progresos biotecnológicos, este proyecto tiene como finalidad desarrollar una forma de entrega ("*Delivery*") de proteínas, directamente en el citoplasma del LB, con producción estable y con la posibilidad de regular su expresión y dosificación, un factor importante que a futuro deseamos explorar. Existen muchos inmunomoduladores naturales, con todo tipo de características, sin embargo, los que mejor desempeño tienen, sin duda, son aquellos producidos por los microorganismos, que buscan modular la respuesta inmune del hospedero para sobrevivir, como lo hace la metaloproteasa GP63 (36–38).

2.0 MARCO TEÓRICO GENERAL

2.1 Metaloproteasa GP63 / Leishmanolysin

La glicoproteína GP63, también conocida como (GP63/Leishmanolysin) o proteasa de superficie mayor (MSP), hace parte de las moléculas más abundantes en la superficie de los promastigotes del parásito *Leishmania spp*; representa aproximadamente el 1% del total de proteínas celulares, y puede ser liberada en exosomas durante la infección intracelular (37,39). Esta metaloproteasa de zinc pertenece a la familia M8 de peptidasas o Metzincinas y presenta un peso molecular de aproximadamente 63 KDa, de donde deriva su nomenclatura. La proteína se encuentra anclada a la membrana plasmática mediante glicosilfosfatidilinositol (GPI), lo que permite su liberación controlada al medio extracelular (40).

La estructura tridimensional de GP63 cuenta con un dominio globular compacto y un núcleo central de láminas β rodeado por hélices α . El plegamiento general sigue el patrón típico de las metaloproteasas, con un sitio activo prominente y accesible que alberga el ion catalítico zinc (Zn^{2+}). La proteína presenta múltiples sitios de glicosilación que contribuyen a su estabilidad y función, así como regiones variables que determinan la especificidad por diferentes sustratos proteicos (41,42).

2.2 Centro activo y coordinación del Zinc

El centro activo de GP63 está caracterizado por un motivo HEXXHXXGXXH, típico de metaloproteasa, en el que las histidinas (H/His), el ácido glutámico (E/Glu) y la molécula de agua (que funciona como nucleófilo en la catálisis), completan la Penta coordinación del Zn^{2+} . Esta geometría bioquímica es fundamental para mantener tanto la integridad estructural del centro activo como su función enzimática (Figura 1) (40,43).

El ion zinc desempeña múltiples roles en la catálisis enzimática. Primero, actúa como un ácido de Lewis, polarizando la molécula de agua coordinada y disminuyendo significativamente su pKa, lo que facilita la formación del ion hidróxido nucleofílico. Segundo, el zinc participa en la estabilización del estado de transición durante la hidrólisis del enlace peptídico, coordinando el oxígeno del intermediario oxianión. Tercero, contribuye al posicionamiento apropiado del sustrato en el sitio activo mediante interacciones con residuos cercanos que terminan formando el sitio de unión (44–46).

De hecho, el ácido glutámico E265, que es un residuo polar cargado negativamente y contiene un grupo carboxílico ($-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$) que es crucial para su función de ligando del zinc, por ser un buen donador de pares de electrones para la coordinación con metales de transición. Cuando este residuo es reemplazado por una alanina (E265A), que es un aminoácido pequeño y no polar, con una cadena lateral constituida únicamente por un grupo metilo ($-\text{CH}_3$), incapaz de participar en interacciones de coordinación con metales y que no posee grupos hidroxilo, carboxilo, amino, o tiol, se queda sin ligandos alternativos. Este cambio resulta en la inactivación de la función proteolítica de GP63 impidiendo la hidrólisis de sustratos. La alteración estructural en el sitio activo causada por la mutación E265A representa una herramienta experimental importante para estudiar las funciones no proteolíticas de GP63 y su rol como modulador inmunológico (47,48).

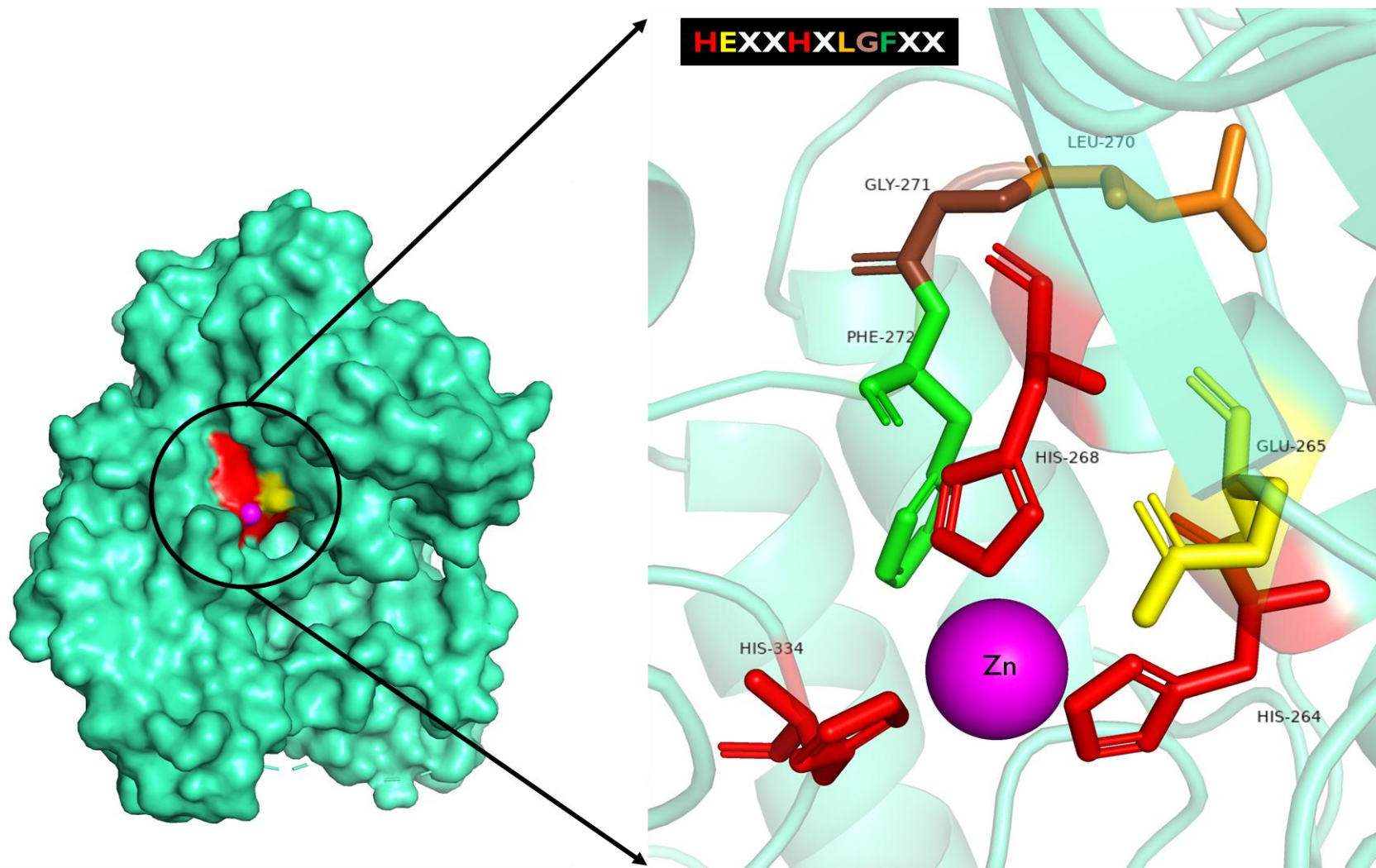


Figura 1 Estructura de la proteína y el centro activo de GP63.

Se observa la proteína sin el anclaje del GPI, se ve distribución de los aminoácidos del centro catalítico, en rojo las Histidinas (His), en amarillo el Ácido Glutámico (Glu) y en morado el Zn²⁺. Esta imagen corresponde a la estructura cristizable 1LML del PDB (Protein Data Bank).

2.3 Mecanismo de corte o clivaje proteolítico

La metaloproteasa GP63 tiene unos aminoácidos sustrato específicos, para realizar el corte proteolítico, los cuales se describen como un aminoácido Polar en P1, uno Hidrofóbico en P1' y dos Básicos seguidos en P2'y P3'(24). Funciona mediante un mecanismo de hidrólisis típico, donde inicialmente el sustrato peptídico se une al sitio activo de la enzima mediante interacciones específicas con residuos que rodean al centro activo. Luego, la molécula de agua activada por el Zn^{2+} realiza un ataque nucleofílico, sobre el carbono carbonílico del enlace peptídico que será hidrolizado, formando una interacción estable (Figura 2) (44).

Durante este proceso, el Zn^{2+} también estabiliza la carga negativa que se desarrolla en el oxígeno carbonílico, durante la formación del estado de transición. La ruptura del enlace peptídico resulta en la liberación de dos fragmentos: uno con un grupo amino libre y otro con un grupo carboxilo libre. Este mecanismo permite a GP63 procesar múltiples sustratos, incluyendo factores de transcripción como AP-1 y quinasas como p38 MAPK, alterando significativamente las vías de señalización celular (41). Se ha descrito que esta proteasa puede romper los enlaces peptídicos de moléculas del sistema inmune como el correceptor CD4 (42), C3b del sistema del complemento (49,50), mTOR, algunas caspasas y MAPK quinasas (51–53). También, modula péptidos antimicrobianos, inhibe la acidificación del fagolisosoma (54), altera la formación del inflamosoma (55), y puede inhibir quemoquinas como CXCL10 y factores de transcripción como NF- κ B (56). Sin embargo, la inmunomodulación de las moléculas del sistema inmune no solo recae en su función proteasa, sino que también puede activar otras proteínas reguladoras como las SHP-1, cuya función principal es retirar los fosfatos de los motivos de activación ITAM, de las proteínas de la señalización y de las quinasas amplificadoras de la señal, este mecanismo diferente al corte proteolítico aún está por esclarecer (47,57) (Tabla 1.0).

La característica de GP63 de poder modular las moléculas del sistema inmune (34,37,38), es lo que nos ha permitido sugerir, su evaluación como inmunomodulador de linfocitos B, célula relevante para nuestro grupo.

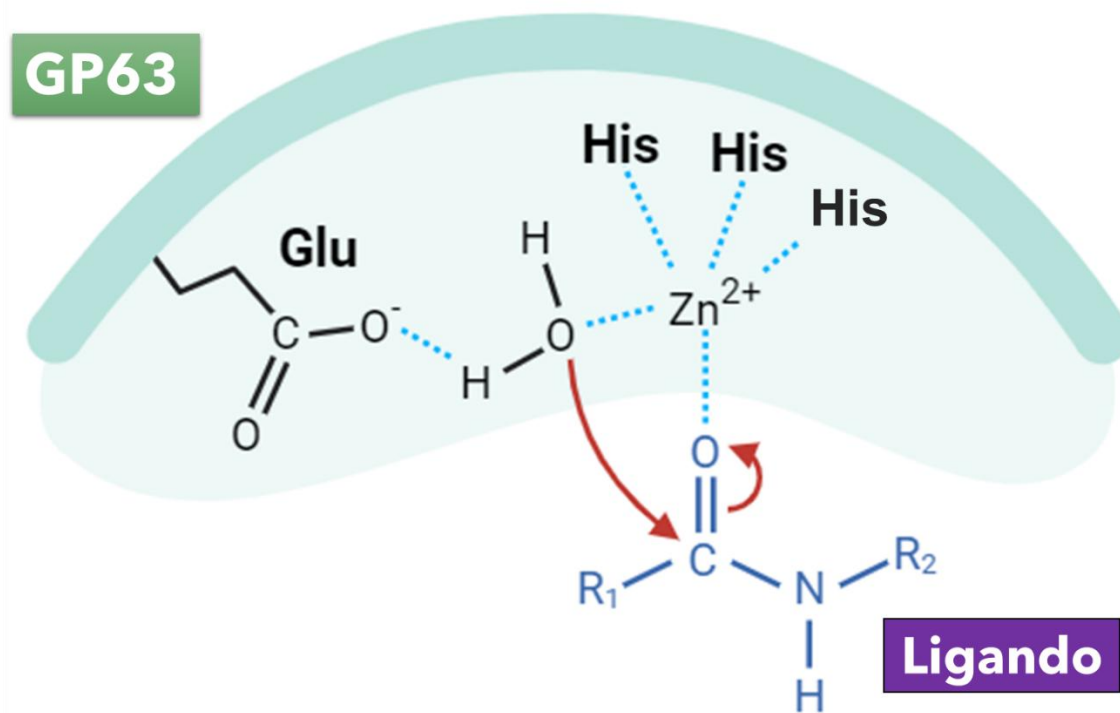


Figura 2 Descripción del efecto proteolítico de GP63.

Mecanismo de hidrólisis de GP63 sobre un ligando. La Penta coordinación del Zn^{2+} con las Histidinas, la molécula de H_2O y el Ácido Glutámico, realizando el ataque catalítico sobre el carbono del aminoácido ligando.

Tabla 1 Colección de moléculas hidrolizadas por GP63.

Molécula Sustrato	Secuencia de Corte Sugerida	Efecto sobre la Molécula	Referencia Bibliográfica
Caspasa-3	NE	Corte. Inducción de la apoptosis del huésped.	Hallé M, J Biol Chem. 2009 Mar 13;284(11):6893-908.
CD4 (LT humano)	NE	Corte/Degradación	A S Hey, Vol 152, Issue 9, May 1994, Pages 4542-4548.
C-Jun (AP-1)	NE	Corte/Degradación.	Guay-Vincent MM, PLoS Pathog. 2022 Oct 3;18(10):e1010640.
Complemento C3 α	Péptido-Arg 1320+Ser-Péptido	Corte (N)	Shao S, Front. Microbiol. 10:532.2019
Complemento C3b	NE	Inactivación de C3b. Promueve la evasión de la lisis mediada por el complemento. Facilita la fagocitosis del parásito.	Gómez MA, Virulence. 2010 jul-Aug;1(4):314-8.
Cortactin	NE	Corte. Afecta la reorganización del citoesqueleto de actina en el huésped.	Hallé M, J Biol Chem. 2009 Mar 13;284(11):6893-908.
CXCL10 (Chemokine C-X-C motif ligand 10)	Entre A81 e I82	Corte/Degradación de CXCL10. Suprime la atracción y activación de células inmunes. Evasión de la respuesta inmune del huésped.	Antonia AL, PLOS Neglected Tropical Diseases 15(10): e0009224. 2021
Citocromo (C) 81-104	Ile-Phe-Ala-Gly+Ile-Lys-Lys-Lys-Thr-Glu-Arg-Glu-Asp-Leu-Ile-Ala-Tyr-Leu-Lys-Lys-Ala-Thr-Asn-Glu	Corte (N)	Bouvier J, Biochemistry 1990 29 (43), 10113-10119
Citocromo (C) 81-104	Ile-Phe-Ala-Gly-Ile-Lys-Lys-Lys-Thr-Glu-Arg-Glu-Asp-Leu-Ile-Ala-Tyr+Leu-Lys-Lys-Ala-Thr-Asn-Glu	Corte (N)	Bouvier J, Biochemistry 1990 29 (43), 10113-10119
Citocromo (C) 94-102Leu	Leu-Ile-Ala-Tyr+Leu-Lys-Lys-Ala-Thr	Corte (N)	Bouvier J, Biochemistry 1990 29 (43), 10113-10119
Citocromo (C) 94-102Ser	Leu-Ile-Ala-Tyr+Ser-Lys-Lys-Ala-Thr	Corte (N)	Bouvier J, Biochemistry 1990 29 (43), 10113-10119
DO beta-HLA	Tyr-Arg+Leu-Gly-Ala-Pro-Phe-Thr-Gly-Val-Arg-Lys	Corte (N)	Bouvier J, Biochemistry 1990 29 (43), 10113-10119
Dansyl-Ala-Tyr-Leu-Lys-Lys-Trp-Val-NH2	dansyl-Ala-Tyr+Leu-Lys-Lys-Trp-Val-NH2	Corte (S)	Bouvier J, Biochemistry 1990 29 (43), 10113-10119
Glucagón	His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr+Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp+Leu-Met-Asn-Thr	Corte (N)	Bouvier J, Biochemistry 1990 29 (43), 10113-10119

Glucagón	His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp+Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp+Leu-Met-Asn-Thr	Corte (N)	Bouvier J, Biochemistry 1990 29 (43), 10113-10119
Glucagón	His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp+Leu-Met-Asn-Thr	Corte (N)	Bouvier J, Biochemistry 1990 29 (43), 10113-10119
HLA-CW3	Leu-Arg-Arg-Tyr+Leu-Lys-Asn-Gly-Lys-Glu-Thr-Leu-Gln-Arg-Ala	Corte (N)	Bouvier J, Biochemistry 1990 29 (43), 10113-10119
HLA-CW3	Leu-Arg-Arg-Tyr-Leu-Lys+Asn-Gly-Lys-Glu-Thr-Leu-Gln-Arg-Ala	Corte (N)	Bouvier J, Biochemistry 1990 29 (43), 10113-10119
Insulina cadena β oxidada	Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cya-Gly+Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cya-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala	Corte (N)	Bouvier J, Biochemistry 1990 29 (43), 10113-10119
Insulina cadena β oxidada	Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cya-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr+Leu-Val-Cya-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala	Corte (N)	Bouvier J, Biochemistry 1990 29 (43), 10113-10119
Leishmanolysin	Péptido-Val 100+Val-Péptido	Corte (P)	Bouvier J, Biochemistry 1990 29 (43), 10113-10119
Leishmanolysin	Péptido-Val 100+Val-Péptido	Corte (P)	Bouvier J, Biochemistry 1990 29 (43), 10113-10119
Leishmanolysin precursor	Ala-Arg-Ser-Val-Val-Arg-Asp-Val-Asn	Corte (P)	Bouvier J, Biochemistry 1990 29 (43), 10113-10119
MARCKS (Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate)	NE	Corte/Degradación. Impacto en la adhesión y la motilidad.	Antonia AL, PLOS Neglected Tropical Diseases 15(10): 0009224.2021
MARCKS-like proteína	Péptido-Ser93+Phe-Péptido	Corte (P)	Corradin Sally, Journal of biological chemistry vol 274, (24) 16782-16787, 1999.
mTOR (Mammalian Target of Rapamycin)	NE	Corte/Degradación.	Guay-Vincent MM. PLoS Pathog. 2022 Oct 3;18(10):e1010640.

MRP1 (Multidrug resistance-associated protein 1)	Péptido-Ser92+Phe-Péptido	Corte (N)	Bouvier J, Biochemistry 1990 29 (43), 10113-10119
NLRP3	NE	Corte/Degradación.	Guay-Vincent MM. PLoS Pathog. 2022 Oct 3;18(10):e1010640.
p65RelA (subunidad p65 de NF-κB)	NE	Corte/Degradación.	Guay-Vincent MM. PLoS Pathog. 2022 Oct 3;18(10):e1010640.
PTP1B y TCPTP	NE	Activación. Contribuye a la desfosforilación de proteínas clave de señalización.	Gómez Maria A, 2010. 314 8 Vol1
PTP-PEST	NE	Corte/Degradación.	Guay-Vincent MM. PLoS Pathog. 2022 Oct 3;18(10):e1010640.
SHP-1 (Src homology 2 domain-containing phosphatase-1)	No se especifica una secuencia de corte exacta, pero GP63 activa esta fosfatasa.	Activación de SHP-1. Desfosforilación de proteínas clave. JAK/STAT, MAP y IRAK-1, comprometiendo la función microbica del huésped.	Guay-Vincent MM. PLoS Pathog. 2022 Oct 3;18(10):e1010640.
Synaptotagmin XI	NE	Corte/Degradación.	Guay-Vincent MM. PLoS Pathog. 2022 Oct 3;18(10):e1010640.
Syntaxin-5	NE	Corte/Degradación.	Guay-Vincent MM. PLoS Pathog. 2022 Oct 3;18(10):e1010640.
TAB1 (TAK-1-binding protein-1)	NE	Corte/Degradación. Impide la interacción de TAB1-p38. Evita la activación de p38 MAPK, lo que suprime las respuestas inmunes.	Gómez Maria A, 2010 314 8 Vol1.
VAMP3	NE	Corte/Degradación.	Guay-Vincent MM. PLoS Pathog. 2022 Oct 3;18(10):e1010640.
VAMP8	NE	Corte/Degradación.	Guay-Vincent MM. PLoS Pathog. 2022 Oct 3;18(10):e1010640.
VSG péptido 38	Ala-Lys-Asp-Ser-Ser-Ile-Leu-Val-Thr-Lys-Lys-Phe-Ala	Corte (N)	Bouvier J, Biochemistry 1990 29 (43), 10113-10119
VSG péptido 36	Ala-Lys-Asp-Ser-Ser-Ile-Leu-Val-Thr-Lys-Lys-Phe-Ala	Corte (N)	Bouvier J, Biochemistry 1990 29 (43), 10113-10119

*NE (No se especifica una secuencia de corte exacta).

La acción moduladora de GP63 representa un ejemplo singular de cómo un mecanismo originalmente destinado a la evasión parasitaria puede transformarse en una herramienta con aplicaciones terapéuticas. Su capacidad para intervenir de manera estratégica en puntos clave de la respuesta inmune, le confiere un valor especial como potencial agente inmunomodulador, pues no actúa de forma indiscriminada, sino que orienta la respuesta hacia un estado de menor inflamación y control regulado.

Esto resulta particularmente relevante en las enfermedades inmunomediadas, donde las terapias actuales muestran limitaciones en eficacia y especificidad. En este sentido, GP63 se perfila como una alternativa prometedora para el diseño de nuevas intervenciones que aprovechen sus propiedades reguladoras, lo que justifica su exploración en este trabajo.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar el efecto sobre el inmuno-fenotipo y la función de Linfocitos B, de la línea celular Ramos y Mononucleares de Sangre Periférica humanas, expuestas a la metaloproteasa GP63 (Leishmanolysin) *in vitro*.

3.2 Objetivo Específicos

3.2.1 Establecer la dinámica molecular de la interacción entre GP63 y la proteína SYK de la señalización de los Linfocitos B in silico.

Indicadores:

- Protocolo de Docking Molecular proteína-proteína realizado y seleccionado.
- Dinámica molecular del modelo de GP63 en interacción con la proteína SYK de Linfocitos B *in silico* establecida.

3.2.2 Producir la proteasa GP63 recombinante y establecer un sistema de expresión constitutiva de la proteasa en líneas celulares humanas.

Indicadores:

- Células linfoides y mieloides transfectadas con plásmido L. major_gp63 WT (Wild type-Nativo) y mt (Mutado).
- Células linfoides transducidas con vector lentiviral LV-MND-GP63 WT y LV-MND-GP63 mt.
- Expresión de la proteína GP63 en líneas celulares de linfocitos B (Ramos) detectada.

3.2.3 Evaluar el efecto biológico de la expresión de la proteína GP63 sobre moléculas de linfocitos B in vitro.

Indicadores:

- Expresión de marcadores de activación, de linaje y maduración de linfocitos B (HLA-DR, CD40, CD38, CD19, CD27, CD45, CD11b) evaluada.
- Expresión de proteínas intracelulares en linfocitos B (Syk, STING, Caspasa 3) evaluada.
- Tipo de muerte celular en los linfocitos B expuestos a GP63 intra y extracelular, identificada.
- Producción de las citoquinas IL-6, TNF antes y después de la activación de los linfocitos B, determinada.
- Secreción de IgM antes y después de la activación de los linfocitos B, detectada.

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Diseño del estudio

Este estudio busca evaluar el efecto de GP63 sobre los linfocitos B y sus proteínas de señalización, activación, maduración y linaje celular. Es un estudio experimental en el que se produjo la proteína recombinante y se creó un sistema de expresión constitutiva de la proteína GP63. Inicialmente, se hizo la exploración *in silico* de la interacción de GP63 con proteínas de interés en la inmuno biología de los linfocitos B, buscando establecer blancos moleculares viables para la intervención *in vitro*. Posteriormente, se llevó a cabo la transfección de células HEK293T con un plásmido de expresión de la proteína con el objetivo de obtener la proteína GP63 purificada y concentrada para su uso en ensayos *in vitro* con LB (expuestos a la proteína recombinante).

En tercer lugar, se desarrolló un vector lentiviral con el transgén de la proteína GP63 (LV-MND-GP63) en células GPRTC (modificación de HEK293T) suministradas por el laboratorio GIS/LCIM del NIH. Posteriormente, se purificó y cuantificó el vector, y se realizó transducción de células linfoides y mieloides; obteniendo la producción de la proteína GP63 intracelularmente en los LB. Finalmente, se realizó la evaluación del efecto de la proteína sobre los LB y su estado de activación, maduración, diferenciación y linaje celular.

Es importante resaltar y destacar, el apoyo de nuestros financiadores en cada una de las fases que hicieron posible este trabajo. La fase *in silico* de docking molecular, se desarrolló en el laboratorio de Bioquímica e Inmunología de la *Universidade Federal de Minas Gerais, (UFMG)* con el apoyo financiero de la *Universidad del Valle*, a través de la beca *CIAM*, también bajo la contribución de la beca del programa de fellows de la *United Nations University Biotechnology Programme for Latin America and the Caribbean (UNU-BIOLAC)*, su respaldo fue fundamental para el desarrollo de este trabajo.

La dinámica molecular y fase experimental de “wet Lab” fue financiada por los *National Institutes of Health (NIH)* de los estados Unidos a través del *Pre-doctoral Supplemental Visiting Fellow Award* del programa de *Visiting Fellow del National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)* del programa de investigación intramural (IRP por sus siglas en inglés). Los experimentos se realizaron en la *Genetic Immunotherapy Section (GIS)* que hace parte del *Laboratory of Clinical Immunology and Microbiology (LCIM)* en Bethesda, MD, USA.

4.2 Población de estudio y Consideraciones Éticas

Este proyecto cuenta con la evaluación del Comité de Ética en Investigación en Salud, de la Universidad del Valle con código NA 013-025 con su más reciente aprobación del 01-julio-2025 quien considera que el proyecto no requiere aval ya que se utilizan líneas celulares en los experimentos *in vitro*.

En los objetivos 2 y 3 de esta tesis se hizo uso de las líneas celulares comerciales de Linfocitos B Ramos (RA-1) ATCC® CRL-1596™, Linfocitos T Jurkat (E6-1) ATCC® TIB-152™, Monocitos THP-1 ATCC® TIB-202™, HEK293T (293T/17) ATCC® CRL-11268™, y células CHO (Chinese Hamster Ovary) Gibco ExpiCHO-S™ Cells # A29127. Todas adquiridas oficialmente por los laboratorios en donde se llevaron a cabo los experimentos.

En las 3 muestras de sangre total de donantes sanos voluntarios para obtención de MNSP (Mononucleares de sangre periférica); el aval ético fue gestionado por el programa de voluntarios del NIH: “Healthy Volunteer for Clinical Research” y las muestras conservadas en el biobanco del NIH. A cada participante se le comunican los objetivos, riesgos y beneficios del estudio. Se hizo entrega de su consentimiento informado, que cada participante leyó, entendió y firmó autorizando su participación en ensayos de investigación de forma voluntaria.

Los ensayos se realizaron por completo en laboratorios con nivel de bioseguridad BSL-2 en cabinas de flujo laminar, siendo seguro para el operador y sin que se replique el lentivirus en el hospedero humano, ni ningún otro vector no viral empleado en el proyecto. Con el fin de disminuir el nivel de Riesgo Mínimo que conllevaba este proyecto (Resolución No. 008430 del 4 de octubre de 1993). Solo el personal entrenado fue responsable de los procedimientos realizados y se llevaron a cabo bajo las normas de bioseguridad, asepsia y antisepsia. Todos los experimentos que se realizaron en este estudio fueron única y exclusivamente con propósitos de investigación. No se declaran conflictos de interés.

4.3 Manejo de datos estadísticos

Fuente de los datos: Experimentos y ensayos de laboratorio.

Cada ensayo *In vitro* de transfección y transducción contó con al menos 3 repeticiones experimentales. Los análisis de evidencia del efecto de la proteína GP63, se realizaron a partir de las repeticiones experimentales con réplicas biológicas por duplicado en cada placa. Los datos numéricos obtenidos durante las cuantificaciones de los títulos virales (Cts) del software del equipo del qPCR, fueron normalizados con el gen *mk/2*. Se definieron los niveles de expresión relativa por el método de $\Delta\Delta C_t$ y fueron registrados en un archivo de Microsoft Office Excel. Las concentraciones de GP63, IL-6, TNF e IgM se obtuvieron por ensayos inmuno enzimáticos (ELISA), se calcularon con las respectivas curvas de cuantificación recomendadas por cada kit de uso.

La hipótesis de normalidad de los datos se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk, en los casos en los que se rechace la hipótesis nula de esta prueba se utilizó la mediana como medida de tendencia central y el rango como medida de dispersión, mientras que, si cumplen la normalidad de los datos, estos fueron representados con el promedio como medida de tendencia central y el error

estándar como medida de dispersión. Las variables se representaron mediante gráficas de puntos, barras, líneas estratificadas según el tipo de dato.

Se realizaron análisis de varianza ANOVA para determinar las diferencias en la expresión y concentraciones de los marcadores evaluados. Si los datos no seguían la distribución normal se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis o de Mann-Whitney con sus comparaciones múltiples. En los casos en que fuera necesario se realizó una regresión no lineal para la identificación de datos atípicos o (Outliers) con la metodología de ROUT (Robust regression and outliers removal), se retiraron los puntos seleccionados por el programa estadístico y se realizó nuevamente el análisis. Todas las hipótesis de la tesis fueron consideradas con nivel de significancia de 0.05. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism (GraphPad Software), versión 6 y 10.

Figura 3 Estrategia experimental objetivo 1.0

Establecer la dinámica molecular de la interacción entre GP63 y las proteínas de señalización celular de LB *in silico*.

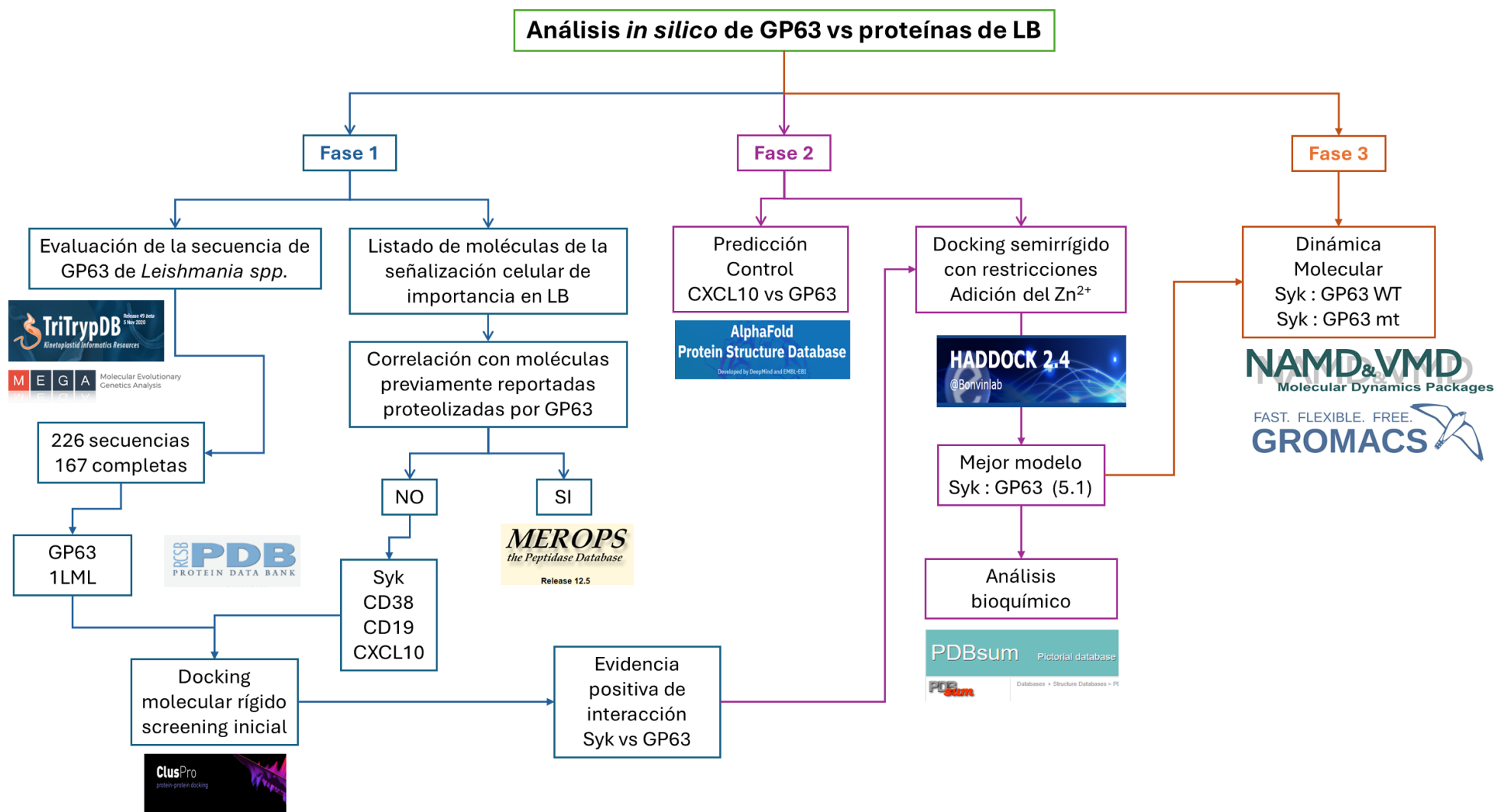


Figura 4 Estrategia experimental objetivo 2.0

Producir la proteasa GP63 recombinante y establecer un sistema de expresión constitutiva de la proteasa en líneas celulares humanas.

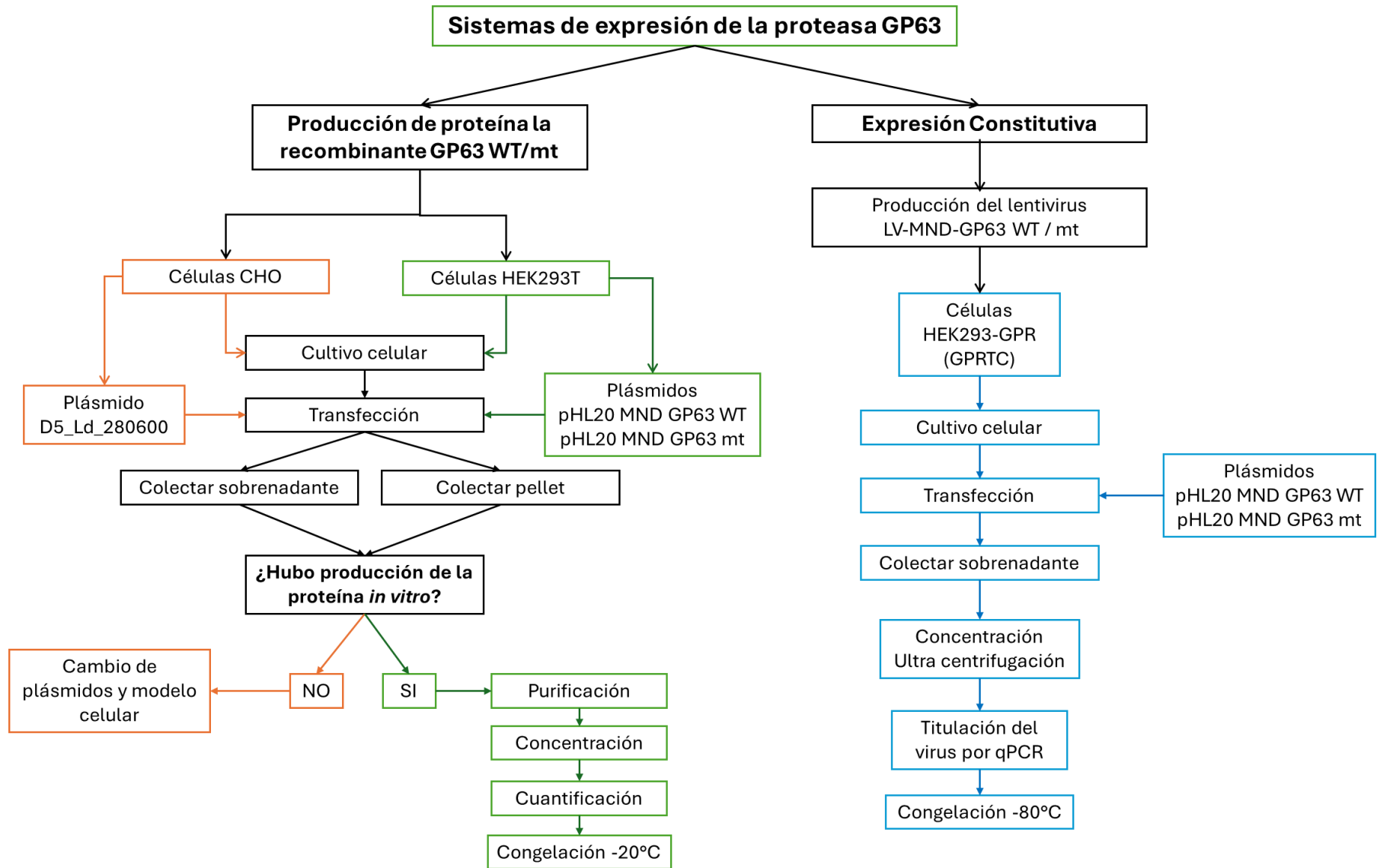
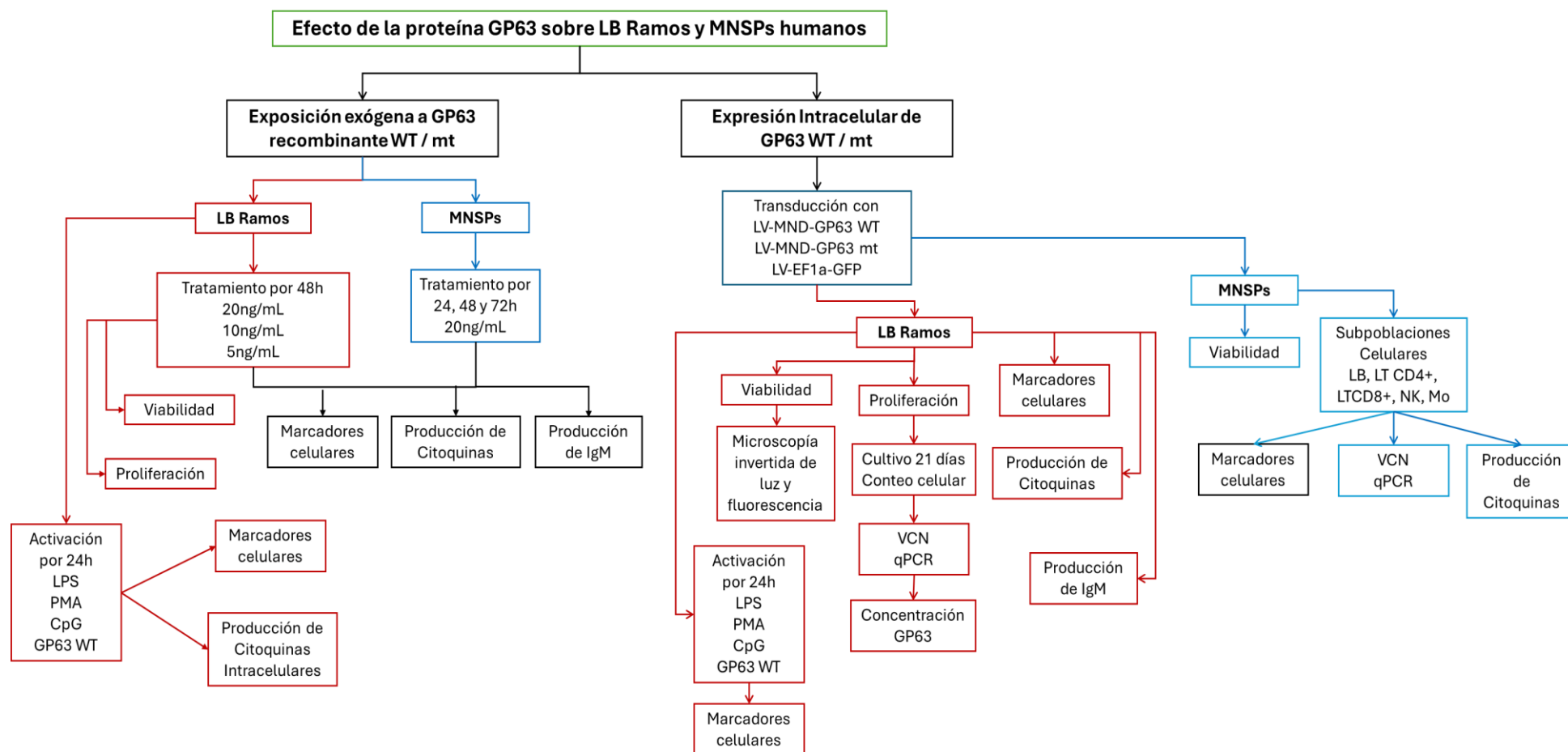


Figura 5 Estrategia experimental objetivo 3.

Evaluar el efecto biológico de la expresión de la proteína GP63 sobre moléculas de LB *in vitro*.



5.0 CAPÍTULO 1

OBJETIVO ESPECÍFICO: Establecer la dinámica molecular de la interacción entre GP63 y las proteínas de señalización celular de Linfocitos B *in silico*.

5.1 MARCO TEÓRICO

5.1.1 Docking molecular

El docking molecular es una técnica *in silico* empleada para predecir la orientación y afinidad de unión entre un ligando (pequeña molécula, péptido o proteína) y su macromolécula receptora (proteína, ADN, ARN). Se utiliza para identificar los modos de unión más probables y estimar la fuerza de la interacción, siendo una herramienta esencial en el diseño de fármacos, cribado virtual y estudio de mecanismos moleculares (58,59). Según el grado de flexibilidad considerado, el docking puede clasificarse como rígido (receptor y ligando permanecen estáticos), semirrígido (el ligando es flexible y el receptor permanece estático) o flexible (ambos adaptan su conformación durante el acoplamiento). Asimismo, el proceso puede realizarse con o sin restricciones espaciales, incorporando información experimental previa, como el sitio activo o residuos clave para la unión (59,60).

Las plataformas más usadas incluyen AutoDock y AutoDock Vina (61,62) (de código abierto, ampliamente adoptadas), Glide (Schrödinger, alta precisión comercial), GOLD (CSD, versátil en manejo de flexibilidad), HADDOCK (63,64) (especializado en docking dirigido por datos experimentales), ClusPro (65,66) (orientado a interacciones proteína–proteína), SwissDock (interfaz web amigable) y ZDOCK (rápido y específico para proteínas). Cada una presenta ventajas y limitaciones en precisión, tiempo de cálculo y manejo de flexibilidad. Aunque el docking es fundamental para un cribado inicial, sus limitaciones incluyen la simplificación del

solvente y la falta de modelado completo de los cambios conformacionales, lo que puede llevar a falsos positivos o negativos (67,68).

5.1.2 Dinámica molecular

La dinámica molecular (MD) es una técnica computacional que simula el movimiento de los átomos y moléculas en función del tiempo resolviendo las ecuaciones de Newton. Permite evaluar la estabilidad estructural de un complejo, los cambios conformacionales, las interacciones dinámicas y la influencia del solvente en condiciones que imitan el entorno fisiológico (69). A diferencia del docking, la MD incorpora de forma explícita la energía térmica, la flexibilidad de la molécula y la influencia del entorno, lo que ofrece predicciones más realistas (70).

Existen variantes como steered MD (para estudiar rutas de disociación o asociación), accelerated MD (para explorar eventos raros en menor tiempo), replica-exchange MD (para muestrear mejor el espacio conformacional) y coarse-grained MD (para simular sistemas grandes reduciendo el detalle atómico) (71–73).

Las plataformas más utilizadas son GROMACS(74) (código abierto, alta eficiencia y compatibilidad GPU), AMBER (amplia biblioteca de campos de fuerza), NAMD (75), (escalable para supercomputación), CHARMM (76) (robustez y métodos híbridos QM/MM) y Desmond (rápido y optimizado para cálculos masivos). La elección de la plataforma depende de factores como disponibilidad de licencias, recursos computacionales y requerimientos de precisión.

La combinación de docking y dinámica molecular es estratégica: el docking proporciona hipótesis rápidas sobre la orientación de unión y la MD refina estas predicciones, evalúa su estabilidad y permite calcular energías libres más precisas, optimizando así el diseño experimental y reduciendo costos y tiempo en laboratorio (77–79).

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Identificación bioinformática de GP63 y proteínas diana.

Inicialmente, se realizó una evaluación de la secuencia del centro activo de GP63. De las 223 secuencias reportadas en la base de datos TriTrypDB (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/app>), utilizamos las 167 que tienen la secuencia completa. Se comprobó que la secuencia utilizada para los análisis 1LML, y que está asociada al único producto cristizable de la proteína (PDB ID. 1LML) en el “Protein Data Bank” (PDB), (base de datos de la estructura tridimensional de las proteínas y ácidos nucleicos) (80)(<https://www.rcsb.org/structure/1LML>), es representativa de todas las especies de *Leishmania spp*, independiente de su tropismo y carácter patogénico (Anexo1).

Posteriormente, se realizó un listado de moléculas de la señalización de LB, basados en las referencias bibliográficas relacionadas a la activación celular, supervivencia, diferenciación y linaje (Anexo 2). Este listado se comparó con la base de datos MEROPS “The peptidase database” release 12.5 (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>), obteniendo la clasificación, nomenclatura, secuencia de aminoácidos susceptibles de proteólisis y los sustratos reportados de GP63 (81,82) (Tabla 1.0). Esto con el fin de verificar si algún sustrato coincidía con las moléculas del listado para seleccionar nuevas proteínas blanco. De las que no hubo coincidencia, se buscaron las estructuras cristalizables de las proteínas, según los criterios de selección basado en resolución del cristal, mutaciones, secuencias y ligandos. Ya con esos archivos se realizaron ensayos *in silico* de interacción proteína-proteína, siendo el análisis más relevante el realizado entre GP63 y la proteína SYK en el cual se evidenciaron interacciones directas entre los residuos de SYK (en especial la Lys394) y el centro activo de GP63 (en especial el Glu265).

5.2.2 Análisis de Docking Molecular

Con los archivos de característica (.PDB) incluida una proteína de control (la quemoquina CXCL10) como único reporte de interacción entre una proteína humana y la metaloproteasa GP63 *in silico* (48,83), se buscó comprobar la teoría de corte de GP63 y observar la interacción entre el centro activo y una molécula conocida, con el fin de estandarizar el protocolo de docking molecular. El Docking permite evidenciar la posible interacción entre dos estructuras proteicas. Esta técnica puede realizarse en modalidad rígida, como en la plataforma bioinformática “ClusPro 2.0” (<https://cluspro.org/login.php>) (65,67,68) la cual se empleó en los ensayos iniciales para la selección de proteínas blanco en LB. También puede implementarse en modalidad semirrígida, que permite cierto grado de flexibilidad conformacional, como es el caso de la plataforma “Haddock 2.4” (<https://rascar.science.uu.nl/haddock2.4>) (63,64). Existen otro tipo de recursos computacionales como “Alphafold protein structure data base” (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) (84,85) en los que se recreó por completo la estructura tridimensional de la proteína, solo con la secuencia de sus aminoácidos, e incluso fue posible generar modelos de interacción entre las dos proteínas sin los archivos (.PDB).

De un panel inicial de 10 proteínas candidatas (Tabla 2.0), se priorizó una proteína que tuviera relevancia para la señalización a través del BCR en LB. Finalmente, los modelos de interacción molecular definitivos fueron para la proteína de la señalización intracelular de LB (Syk PDB 4XG2) y (GP63 PDB 1LML), los cuales fueron analizados en Haddock 2.4. Los residuos clave involucrados en la interacción fueron seleccionados basándose en la literatura y análisis de accesibilidad superficial. La parametrización del Docking se realizó definiendo los residuos activos y pasivos dentro de Haddock, empleando restricciones en los aminoácidos en el modo semi-flexible para permitir ajustes conformacionales durante el acoplamiento, también se realizó el refinamiento final en agua, que optimizó la estabilidad del

complejo. Por último, el mejor modelo se sometió a herramientas de cálculo y predicción como “PDBSum” (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PDBsum1/>) (86) y “PDBePISA Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies)” (<https://www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa/>) (87).

Las interacciones moleculares evaluadas en estas plataformas recrearon la interacción proteína-proteína, y arrojaron datos claves sobre la bioquímica de interacción, sin embargo, está recomendado hacer una evaluación más detallada y con condiciones fisiológicas estables y controladas.

5.2.3 Análisis de Dinámica molecular

Con esta simulación computacional se analizó el comportamiento o evolución de la interacción entre las proteínas a través del tiempo. Se calcularon las fuerzas entre los átomos para acercarse o repelerse y se concretó el modelo de interacción a nivel bioquímico y energético. Cada complejo fue hidratado en agua TIP3P pre-equilibrada dentro de una caja cúbica de aproximadamente 120 Å por lado. Las simulaciones se realizaron a una temperatura constante de 37 °C y una presión de 1 atm, utilizando condiciones de frontera periódicas (PBC) y el método de Mallas de Ewald en partículas (PME), con la representación de todos los átomos del campo de fuerza CHARMM36 (versión c4621). Se asumió que todos los residuos estaban sin carga a pH neutro, incluida la histidina, con excepción de D⁻, E⁻, K⁺ y R⁺; el software PropKa (versión 3.5.0) se utilizó para validar esta asignación, usando primero las estructuras iniciales y luego fotogramas tomados a lo largo de la simulación molecular, para mantener la consistencia. Se distribuyeron aleatoriamente 120 mM de iones Na⁺ y Cl⁻, y se añadieron 13 Na⁺ para neutralizar los sistemas después de introducir el ion Zn²⁺ en el sitio catalítico. La proteína GP63 contenía nueve puentes disulfuro, mientras que Syk no presentaba ninguno.

Siguiendo el protocolo estándar de minimización, calentamiento y equilibrio, se realizaron tres simulaciones independientes (fase productiva) de 200 ns cada una,

en el ensamble NPT con “VMD-NAMD” (versión 3.0) (75,88) para los complejos de Syk:GP63 nativo o de tipo silvestre (WT) y el mutante E265A. Los datos se recopilaron en conjuntos únicos para su análisis durante la segunda mitad de la simulación, asegurando que se hubieran producido todas las reestructuraciones transitorias. Este enfoque permitió un estudio comparativo de las conformaciones e interacciones en la interfaz Syk:GP63. Las redes de interacción se calcularon con base en un criterio de distancia (δ): las interacciones polares (incluyendo enlaces de hidrógeno y puentes salinos) y no polares (incluyendo interacciones hidrofóbicas y de dispersión); se definieron según la distancia entre átomos donadores y aceptores de cadenas laterales ($\delta_{AD} < 3 \text{ \AA}$) y entre átomos de carbono de cadenas laterales ($\delta_{CC} < 4.8 \text{ \AA}$), respectivamente. La fuerza de una interacción entre dos residuos es una medida del número y persistencia de la interacción a lo largo de la simulación, y sirve como aproximación de su intensidad; las estadísticas correspondientes se muestran en los resultados.

Tabla 2 Secuencias PDB de cristales analizados

Nombre	PDB Cod.	Clasificación	Organismo	Mutaciones	Método	Resolución (Å)	Secuencia (aa)	Ligandos
<i>Leishmanolysin (GP63)</i>	1LML*	Metaloproteasa	<i>L. major</i>	—	Difracción de Rayos X	1.86	478	Zn ²⁺
<i>Syk tandem SH2 + phospho-ITAM péptido</i>	1A81	Complejo de proteína adaptadora	<i>Homo sapiens</i>	—	Difracción de Rayos X	3.0	256	Phospho-ITAM péptido
<i>Syk kinase + AZ13344324-2 inhibidor</i>	6ZCU	Tirosina quinasa (Transferasa)	<i>Homo sapiens</i>	—	Difracción de Rayos X	1.73	299	AZ13344324-2
<i>Syk kinase (apo)</i>	4XG2*	Tirosina quinasa (Transferasa)	<i>Homo sapiens</i>	—	Difracción de Rayos X	2.21	620	—
<i>Syk kinase + inhibidor G206/G207/O259/etc.</i>	4XG7	Tirosina quinasa (Transferasa)	<i>Homo sapiens</i>	—	Difracción de Rayos X	1.76	290	X7G ligando
<i>CD38 ectodominio + inhibidor covalente</i>	8P8C	Hidrolasa (ADP-ribosil ciclasa)	<i>Homo sapiens</i>	Sí (4)	Difracción de Rayos X	2.0	256	Pyrazole-based inhibidor
<i>CD19 ectodominio (N138Q) + B43 Fab</i>	6AL5	Inmunoglobulina receptor	<i>Homo sapiens</i>	N138Q	Difracción de Rayos X	3.0	300	B43 Fab fragmento, NAG
<i>CXCL10 / IP-10 quimioquina</i>	1LV9	Quimioquina	<i>Homo sapiens</i>	—	NMR Espectroscopia	—	77	—
<i>CXCL10 (M-form tetramero)</i>	1O7Y	Quimioquina (C-X-C motif)	<i>Homo sapiens</i>	—	Difracción de Rayos X	3.0	77	SO ₄ ²⁻

* Secuencias del modelo 5.1 del docking y dinámica molecular

-Syk (Spleen tyrosine kinase) *L. major* (*Leishmania major*)

-NMR(Resonancia magnética nuclear)

-NAG (2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranose).

5.3 RESULTADOS CAPÍTULO 1

5.3.1 Análisis computacional de la interacción de GP63 con proteínas de la activación de linfocitos B humanos.

Con el objetivo de esclarecer el efecto de la interacción entre GP63 y posibles blancos moleculares en los LB, se realizaron acoplamientos *in silico* tipo Docking entre proteína-proteína, esperando que coincidiera en la interacción molecular el centro activo catalítico de la proteasa y los sitios postulados de clivaje en las proteínas blanco. Se utilizó como control de estandarización de las condiciones del docking, el único reporte tipo proteína-proteína entre GP63 y una molécula del sistema inmune, la citoquina CXCL10 (Anexo 1). Posterior al filtro realizado de selección de blancos moleculares, la mejor interacción obtenida en docking exploratorio, fue para Syk (4XG2 .pdb) y GP63 (1LML .pdb) cuyos resultados se presentan a continuación.

5.3.1.1 El modelo de docking molecular in silico de GP63 y Syk sugiere una favorable capacidad de interacción.

El acoplamiento molecular semirrígido entre GP63 y Syk tuvo en cuenta la puntuación HADDOCK, que indica a cuántas desviaciones estándar de la media se encuentra un “clúster” (grupo) en términos de puntaje (cuanto más negativo, mejor). Se obtuvieron 122 estructuras en 14 clúster(es), lo que representa el 61 % de los modelos. El mejor clúster es el (nº 5.1), con una media de -74,0 +/- 8,2 kcal/mol, lo que indica una interacción bioquímica muy favorable. La mejor pose de acoplamiento dentro de este clúster tenía una puntuación HADDOCK individual de Z-score -0,1 kcal/mol, con contribuciones de energías de Van der Waals (-47,2 +/- 9,3 kcal/mol), electrostáticas (-166,9 +/- 57,5 kcal/mol) y de desolvatación (-3,0 +/- 4,9 kcal/mol) (Tabla 3.0). Estos valores respaldan energéticamente la interacción entre las dos proteínas.

Tabla 3 Resultados de puntajes y energías de los mejores modelos de acoplamiento molecular.

Parámetro de interacción	CLÚSTER 2	CLÚSTER 14	CLÚSTER 5*
HADDOCK score	-94.9 +/- 2.8	-86.9 +/- 4.9	-74.0 +/- 8.2
Cantidad de clústeres	19.00	4.00	9.00
RMSD de la menor energía de la estructura	22.9 +/- 0.6	24.6 +/- 0.5	8.9 +/- 0.1
Energía de Van der Waals	-48.0 +/- 5.0	-41.7 +/- 4.3	-47.2 +/- 9.3
energía electrostática	-334.6 +/- 52.5	-328.3 +/- 27.8	-166.9 +/- 57.5
Energía de desolvatación	4.1 +/- 1.9	-2.6 +/- 1.3	-3.0 +/- 4.9
Energía de violación de restricciones	158.9 +/- 46.0	230.0 +/- 51.9	96.8 +/- 17.3
Área de superficie inaccesible	1760.4 +/- 58.3	1933.3 +/- 121.6	1668.2 +/- 73.2
Z-score	-2.30	-1.50	-0.10

*El clúster 5 fue el seleccionado para los ensayos de dinámica molecular.

Comparaciones entre el acoplamiento sin y con restricciones en los aminoácidos de la interacción, revelaron que la inclusión de estas restricciones experimentales conduce a un sitio de unión de Syk más localizado en el centro activo de GP63, con una disminución de la energía de unión y mejora en la precisión del modelo. (Tabla 3.0) (Figura 6.0). Para corroborar estos hallazgos, realizamos el análisis del mejor modelo en la plataforma PDBsum, obteniendo los valores estadísticos de la bioquímica intermolecular entre ambas proteínas.

5.3.1.2 La interfase proteína-proteína de GP63 y Syk es bioquímicamente válida y estable.

Se identifican 2 puentes salinos y 6 puentes de hidrógenos en la interacción. Las distancias entre los aminoácidos His264, His268, His334 y el átomo de Zn^{2+} en GP63 se mantuvieron por debajo de los 3.0Å (2.07, 1.93 y 2.28Å respectivamente); sin signos de cambio conformacional de la proteína por la interacción (Figura 6.0). La relación de residuos involucrados en la interfase fueron 17 para GP63 y 13 para Syk (17:13 res). Para destacar, se identifica el puente de hidrógeno entre el ácido glutámico Glu265 (E265) de GP63 con la lisina Lys394 (K394) de Syk con una distancia significativa de 2.55Å entre estos residuos (Figura 7.0). Éste es el mismo aminoácido observado en el docking molecular, con proximidad al centro activo de la proteasa (Figura 6.0) y que cobra importancia en el análisis, ya que este aminoácido hace parte del sitio de unión postulado para la proteólisis de Syk (QMKK), coincidiendo con la regla de corte de GP63 (Polar/Hidrofóbico/Básico/Básico). La estructura que accede al centro activo es un giro entre dos hojas plegadas beta, dejando accesible el carbono para clivaje proteolítico (Figura 7.0).

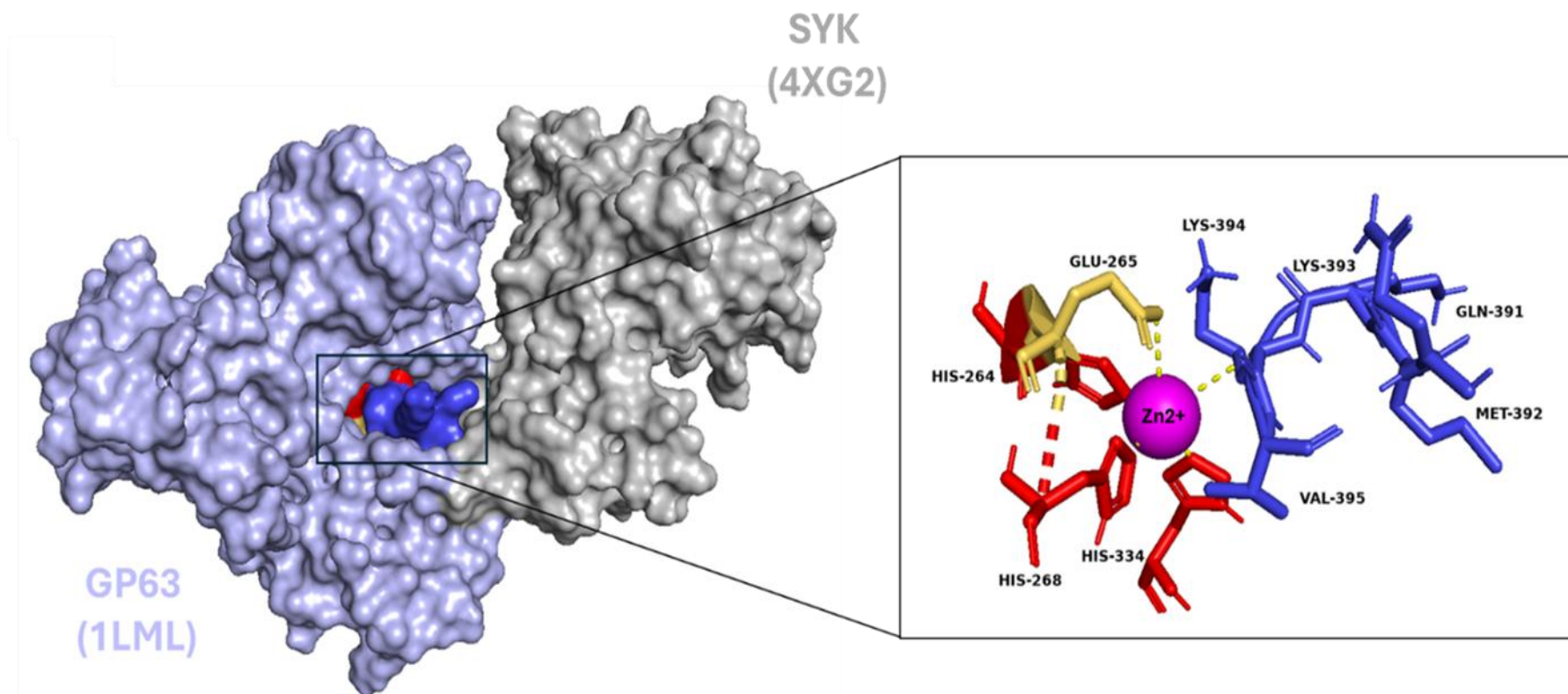


Figura 6 Docking molecular de la interacción proteína-proteína entre GP63 y Syk.

Clúster 5.1 seleccionado según la mejor puntuación Haddock. En azul claro se muestra la estructura en superficie de GP63 y en gris la proteína Syk. En color rojo se representan las histidinas (His264, His268, His334), el ácido glutámico (Glu265) en amarillo en el centro activo de GP63 y el Zn²⁺ Penta-coordinado. En azul oscuro se representan los residuos de aminoácidos de la proteína Syk que ingresan al sitio catalítico en especial la lisina (Lys394). Modelo analizado en software Pymol v2.5.8.

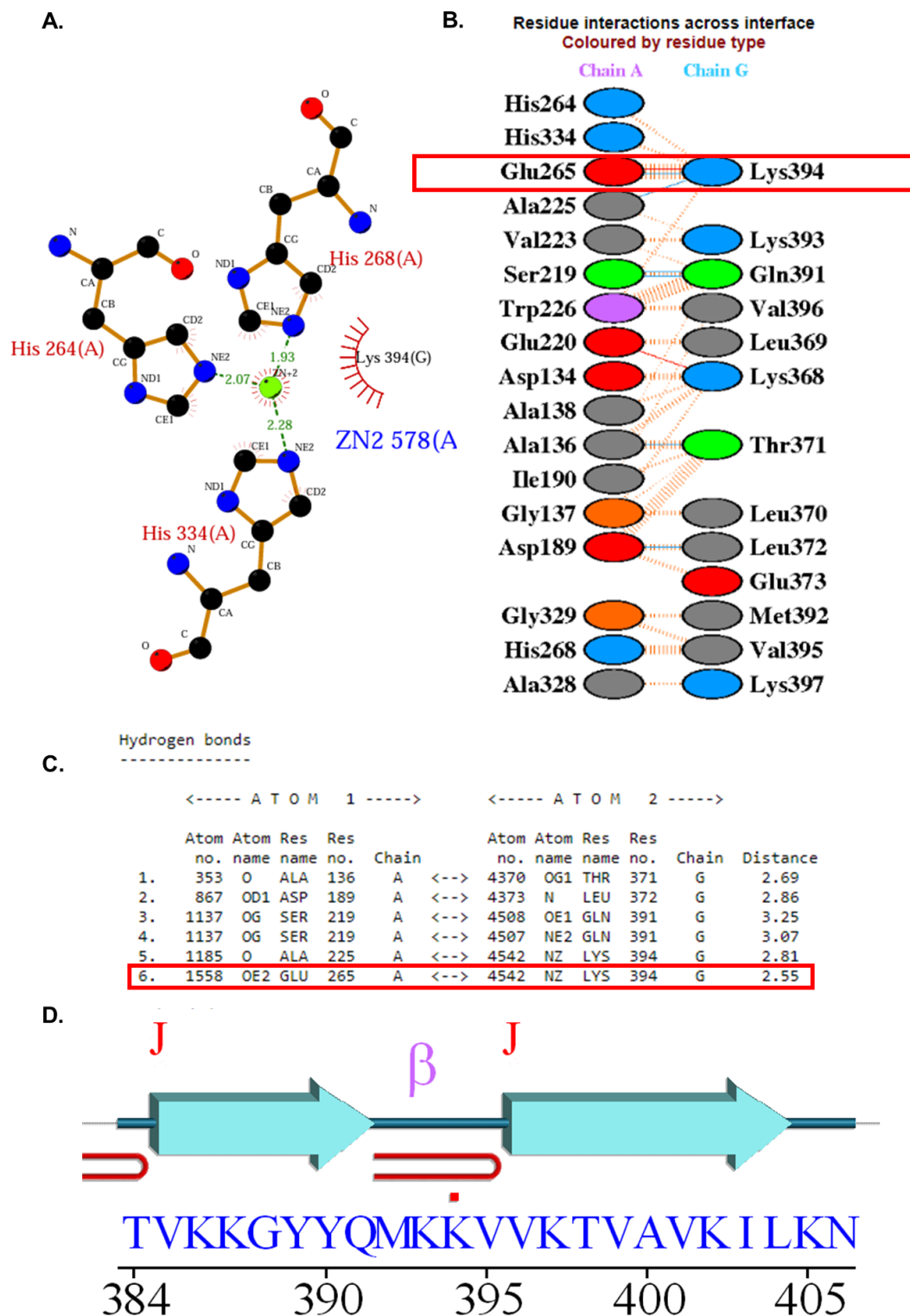


Figura 7 PDBSum análisis del modelo 5.1 interfase GP63:Syk.

Identificación de interacciones intermoleculares que contribuyen a la estabilidad del complejo. **A)** LIGPLOT de los residuos del centro activo de GP63 con el residuo que establece el puente de hidrógeno estabilizador, Lys394 en rojo. **B)** Diagrama de relación de los residuos de la superficie de contacto. **C)** Distancias en Å (angstroms) entre los átomos de la interfase. **D)** Estructura secundaria y secuencia de la interfase donde ocurriría el clivaje proteolítico. Imagen PDBsum análisis.

Establecida la interfase entre estas dos proteínas e identificación de múltiples interacciones, como puentes de hidrógeno y contactos hidrofóbicos de distancias cortas, se procede a realizar simulaciones de dinámica molecular. Dado que el docking representa un modelo estático o semirrígido, como es en nuestro caso; es necesario evaluar la estabilidad bioquímica y estructural del complejo en condiciones fisiológicas y termodinámicas controladas, para determinar posibles cambios conformacionales que favorezcan más o menos la interacción predicha.

5.3.1.3 Dinámica molecular entre Syk y GP63 establecida.

Dado que la sustitución del residuo glutámico E265 por una alanina (E265A) en el centro activo de GP63 reduce significativamente su actividad proteolítica (48,83) se diseñaron dos estrategias comparativas para el análisis mediante dinámica molecular: una con la conformación nativa o tipo salvaje (wild-type, WT) y otra con la mutación puntual E265A (mutante, mt). Las simulaciones se realizaron utilizando el modelo 5.1 obtenido del docking molecular inicial en HADDOCK, sobre el cual se introdujo *in silico* la mutación en el centro activo. Los resultados evidenciaron un cambio conformacional notable en la variante mutada, que respalda computacionalmente la pérdida de actividad enzimática observada para GP63.

El análisis de trayectorias mostró que el complejo se mantuvo estable a lo largo de la simulación, con una RMSD (Root Mean Square Deviation) media de aproximadamente 2,5 Å, en la que valores inferiores a 3Å se consideran aceptables, también se observó disminución progresiva de la energía potencial (Anexo video). Además, el análisis de enlaces de hidrógeno y las mediciones de la superficie de contacto de la interfase, revelaron que los residuos clave mantuvieron interacciones estables a lo largo del tiempo (200ns), lo que sugiere una unión robusta entre Syk y GP63 WT. Por el contrario, el análisis con la secuencia GP63 mt mutada, indica un aumento en las distancias entre los residuos de Syk que ingresan en el sitio catalítico de la metaloproteasa (Valores >10Å) (Figura 8.0).

Las interacciones detalladas entre residuos polares y no polares son descritas en la Figura 9.0, donde observamos como el cambio conformacional por la mutación, hace que los aminoácidos que deberían ingresar al centro activo se alejen y establezcan vínculos con otros aminoácidos periféricos. Esto evita que la lisina (K394) ingrese al centro activo, y por el contrario se una a la serina (S219) que presenta características ácidas, lo opuesto a lo sugerido en la clave de corte esperada por GP63 (sería un aminoácido básico) (Figura 9.0).

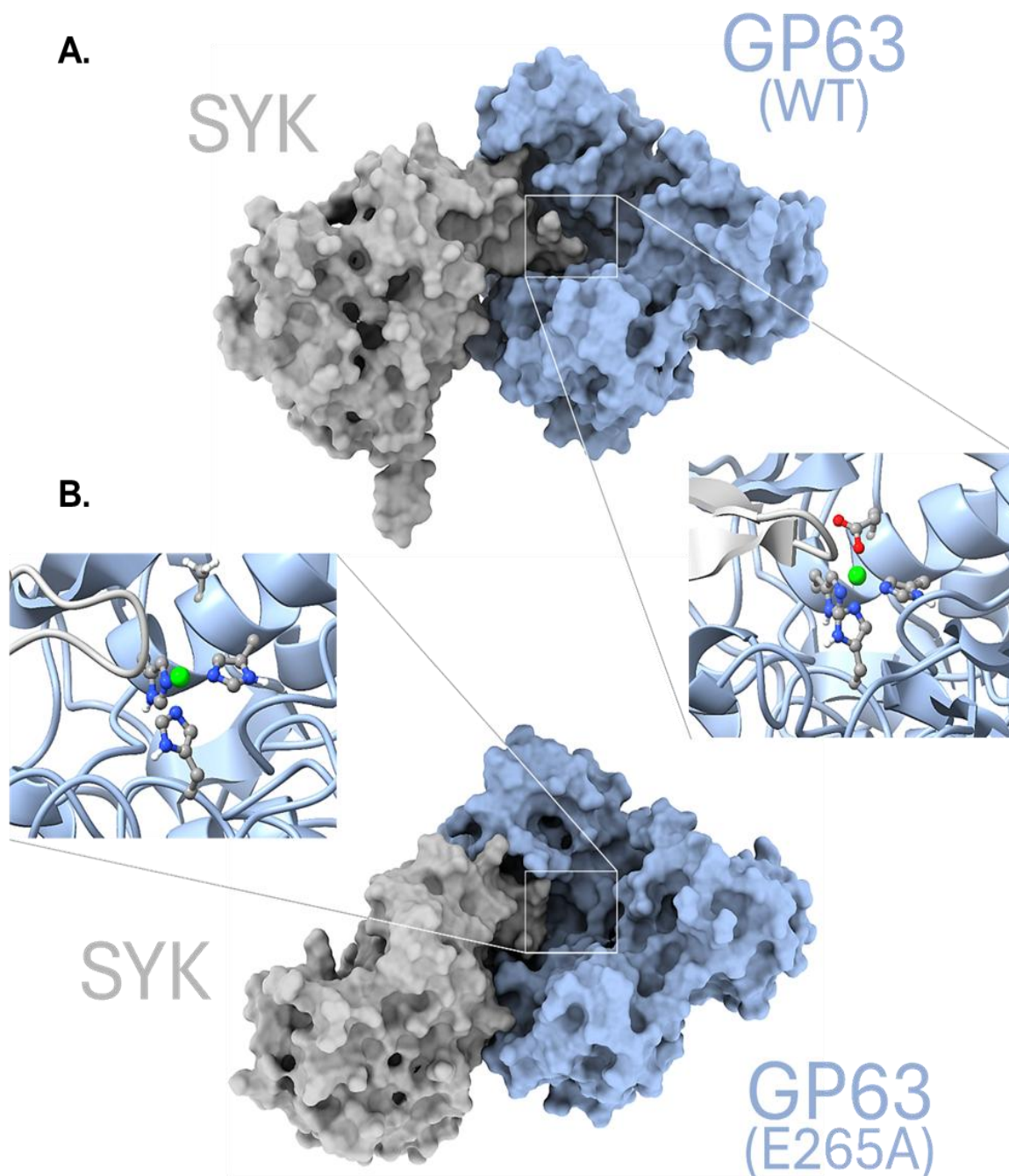


Figura 8 Representación de la superficie molecular del complejo GP63:Syk nativa (WT) y mutante (mt).

Representación del bolsillo catalítico **A)** el ion Zinc en verde; residuos coordinados H264, H268, H334 en azul y E265 en rojo en el WT, **B)** el residuo A265 no coordinado en el mutante (sin color). Los cambios en el patrón de interacciones interfaciales desencadenados por la mutación E265A se sumaron a un reposicionamiento de Syk con respecto a GP63, que puede afectar a la actividad catalítica, posiblemente alterando la coordinación entre el Glu265, el Zn^{2+} y H_2O en el sitio catalítico. Imagen software UCSF ChimeraX v1.9.

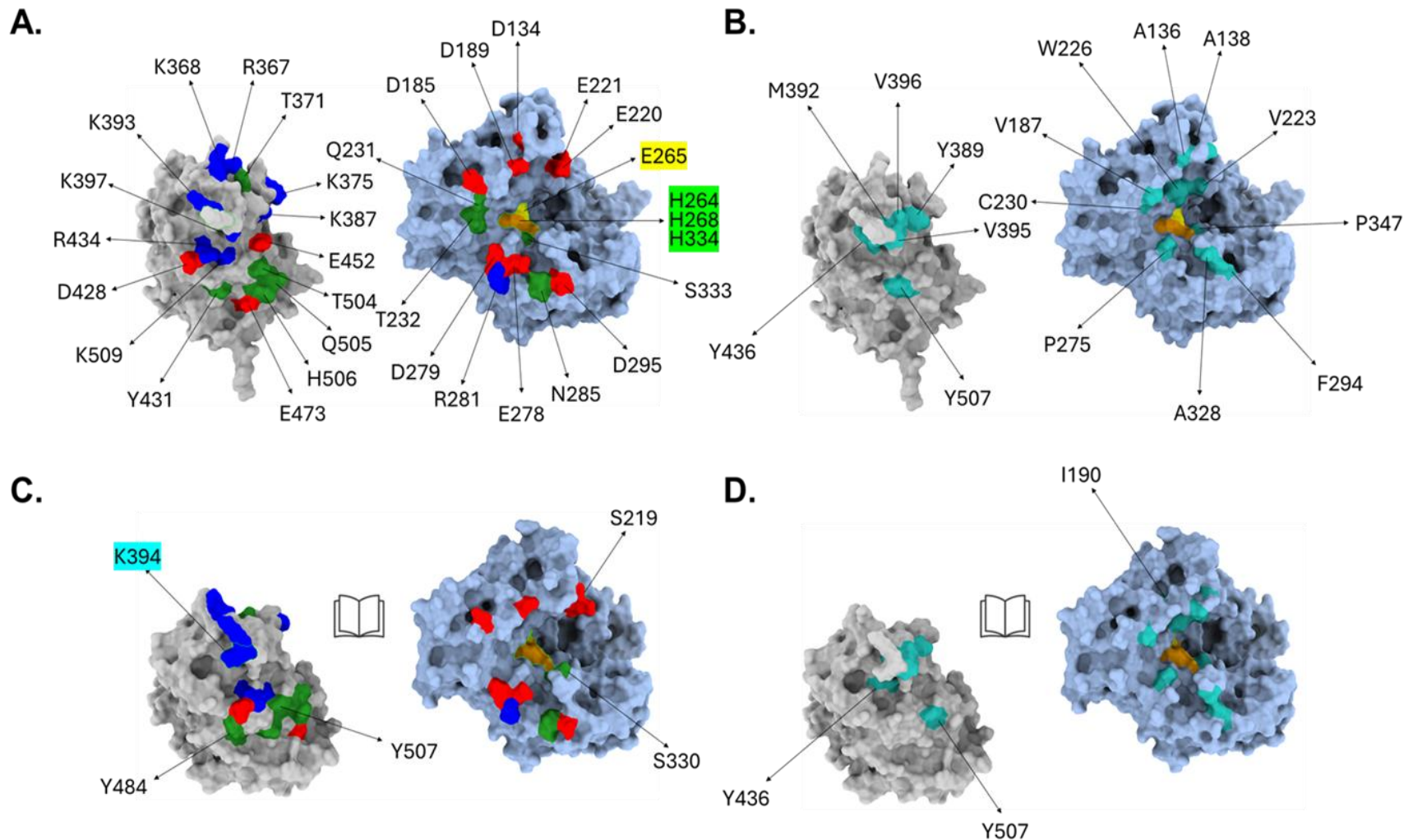


Figura 9 Interacciones polares y no polares en la interfaz del complejo GP63:Syk nativo (WT paneles A y B) y (mt paneles C y D).

A y C) Todas las interacciones polares representados así en **rojo**: residuos ácidos; **azul**: básicos; **verde**: neutro. **B y D)** Principales interacciones no polares (hidrofóbicas, aromáticas o de dispersión) entre grupos no polares de cadenas laterales polares y neutras netas. Los residuos del sitio catalítico de GP63 se resaltan en verde y amarillo en el panel A, y la lisina catalítica de Syk (K394) se muestra en azul claro en el panel C. Las dos proteínas están giradas 90° en direcciones opuestas desde la vista lateral de la Fig. 8 para revelar la interfaz, como indican los iconos de libro. Imagen software UCSF ChimeraX v1.9.

5.4 DISCUSIÓN CAPÍTULO 1

La metaloproteasa GP63 es una proteína presente en la superficie de varias especies de *Leishmania spp*; su importancia radica en su capacidad de alterar la señalización, adhesión, internalización, supervivencia celular y modular de la respuesta inmune del huésped (89). Diversos estudios han empleado herramientas bioinformáticas para entender la estructura, función y propiedades fisicoquímicas de la interacción de GP63 con diferentes ligandos; siempre en el contexto de la infección parasitaria, para comprender su papel como factor de virulencia o como potencial blanco para el desarrollo de tratamientos anti-leishmaniasis (90–92). Sin embargo, hasta la fecha no hay reportes de sus propiedades como agente inmunomodulador exógeno, con capacidad de modular funciones celulares *in vitro* con fines terapéuticos o de investigación. Esta nueva aproximación funcional de GP63, plantea el dejar de considerarla exclusivamente como una molécula patogénica, a reconocer su valor como una herramienta experimental, para inducir estados inmunológicos específicos de forma dirigida.

La estructura cristalográfica disponible de GP63 (PDB ID 1LML) ha sido clave para comprender en profundidad sus propiedades estructurales y funcionales, no solo para descifrar sus mecanismos de acción, sino que también abre la posibilidad de manipularla racionalmente, intervenir sus interacciones y eventualmente redirigir su función (40). Con esto en mente, lo primero que se hizo fue un estudio de acoplamiento molecular (docking) para explorar el comportamiento de GP63 en condiciones *in silico* y, en particular, evaluar si alguna de las proteínas escogidas que hacen parte de la señalización de los LB era capaz de posicionarse en su centro activo de forma compatible con una posible interacción funcional. Tras múltiples ensayos de docking con diversas proteínas candidatas, seleccionamos a Syk (PDB ID 4XG2) como modelo final, dado que presentó la mejor afinidad y una orientación estructural coherente con una posible susceptibilidad a interacción directa con

GP63, siendo Syk además una proteína que participa en la activación de células mieloides lo cual le confiere un rango de acción interesante de evaluar (93).

Syk es una tirosina quinasa citoplasmática fundamental en la señalización de los LB, es un mediador clave de la transducción de señales iniciadas por el complejo BCR. Syk desencadena una cascada de eventos que incluyen activación de BTK, PLC γ 2, aumento del calcio intracelular y finalmente la activación de factores de transcripción como NF- κ B, NFAT y AP-1 (94); todos esenciales para la supervivencia, activación, diferenciación y respuesta funcional de los LB (95,96). Debido a esta posición estratégica en la señalización, Syk ha sido blanco frecuente de interferencia por parte de patógenos que buscan evadir la respuesta inmune adaptativa (96–99). Por esta entre otras razones, seleccionamos a Syk como candidato principal para evaluar su posible interacción estructural con GP63, partiendo de la hipótesis de que la proteasa podría interferir con su función o estabilidad y, por ende, alterar la señalización de los LB.

Para orientar y comparar nuestro análisis, tomamos como referencia el estudio de Antonia et al. 2019/2021 (48,83) el único hasta la fecha que ha realizado docking entre GP63 y otra proteína (CXCL10 para predecir el sitio de unión), dado que la mayoría de los reportes disponibles en la literatura se han enfocado en el acoplamiento de GP63 con moléculas pequeñas o compuestos químicos, no con proteínas (100,101). De igual forma, otros grupos han aplicado dinámica molecular limitada a interacciones con ligandos químicos o a la proteína sola, sin explorar la evolución temporal y conformacional de una interacción proteína–proteína en condiciones simuladas (102). A diferencia de esos estudios, este trabajo de tesis representa, hasta donde hemos podido documentar, el primer análisis de dinámica molecular de GP63 en complejo con otra proteína completa.

En el trabajo de Antonia et al., se hizo acoplamiento en la plataforma Zdock entre GP63 y CXCL10 sin aplicar restricciones (Blind docking), lo cual limitó la precisión del modelo obtenido. Proponen un sitio de corte en la región AIK (aa81-aa83), que

no cumple completamente con el patrón preferido por GP63 (residuos polares, hidrofóbicos, básicos y básicos), descrito en estudios previos como óptimo para su actividad proteasa (43,103). Recreamos *in silico* la misma simulación, (GP63:CXCL10) con el fin de estandarizar nuestro protocolo, y no tuvimos coincidencia con los datos reportados por ellos. No observamos que la secuencia reportada AIK estuviese cerca del centro activo en todos los modelos que arrojó la plataforma ClusPro. Aunque en ese estudio no se incorporaron restricciones específicas durante el docking como (data-driven docking) o AIRs (ambiguous interaction restraints), sus resultados fueron posteriormente respaldados por evidencia experimental que al parecer confirmó la interacción y el clivaje funcional de la quemoquina CXCL10 (83).

Este hallazgo sugiere que, en algunos casos, el acoplamiento ciego puede identificar interacciones fisiológicamente relevantes, no obstante, la ausencia de restricciones podría aumentar el riesgo de falsos positivos, y por eso, el usar datos de predicciones funcionales para guiar el docking, sigue siendo una estrategia más robusta y controlada. En nuestro caso, optamos por esa aproximación más racional y dirigida, incorporando criterios estructurales y funcionales en nuestros ejercicios de docking, como la adición del Zn^{2+} y el H_2O que son vitales para la proteólisis.

Los resultados del docking inicial mostraron una interacción energéticamente muy favorable con una media HADDOCK de -74.0 ± 8.2 kcal/mol y un Z-score individual de -0.1 kcal/mol. Esta interacción está respaldada por 2 puentes salinos y 6 puentes de hidrógeno, siendo crucial el puente de hidrógeno entre el ácido glutámico (E) Glu265 de GP63 y la lisina Lys394 de Syk. Este dato es muy importante ya que si coincide la secuencia postulada de corte en Syk (QMKK) con la regla de GP63, indicando un potencial clivaje proteolítico.

El docking molecular considera a la proteína como una estructura rígida o semirrígida, y se enfoca en encontrar la mejor "pose" de unión para el ligando (67). Mientras que, la dinámica molecular simula el comportamiento de las moléculas en

función del tiempo bajo condiciones fisiológicas (temperatura, presión, solvente), para calcular la evolución del sistema completo, permitiendo observar la estabilidad de la interacción, fluctuaciones conformacionales, formación de puentes de hidrógeno, entre otros fenómenos que no son capturados por el docking y que podrían ocurrir biológicamente *in vitro* o *in vivo*.

Las simulaciones de dinámica molecular que han realizado otros grupos han demostrado la rigidez, la poca heterogeneidad y la conservación de los residuos del centro activo de GP63, siendo una característica única a diferencia de las otras metaloproteasas del mismo grupo como la collagenasa neutrofílica humana (MMP-8) (104). Por eso consideramos confirmar el comportamiento de nuestro modelo por análisis de dinámica molecular y verificar si la interacción era estable y duradera o si requería un cambio conformacional de la proteína.

Nuestras simulaciones de dinámica molecular demostraron la estabilidad del complejo (GP63 : Syk) con la proteína de tipo salvaje (WT) en condiciones fisiológicas y termodinámicas controladas, manteniendo un RMSD medio de aproximadamente 2.5 Å y conservando las interacciones clave a lo largo de 200 ns, lo que sugiere una unión robusta. La validación experimental de este modelo *in silico* se reforzó al observar que la mutación puntual E265A en el centro activo de GP63, conocida por disminuir notablemente su función proteolítica, provocó un cambio conformacional que impidió la entrada de la Lisina 394 de Syk al sitio catalítico y alteró las interacciones en la interfase. Este hallazgo no solo respalda la pérdida de actividad enzimática de GP63 por la mutación E265A, sino que también confirma la importancia crítica del ácido glutámico Glu265 en la interacción (GP63 : Syk) y en el mecanismo de corte o clivaje.

Estos hallazgos proporcionan evidencia *in silico* que apoya fuertemente la interacción y potencial clivaje de Syk por GP63, sentando las bases para futuras investigaciones experimentales que esclarezcan el papel funcional de esta interacción en la inmunobiología de los LB. Sin embargo, Aunque los modelos *in*

silico que utilizamos predijeron una interacción favorable entre GP63 y Syk, experimentalmente no observamos alteración del nivel total de Syk por citometría de flujo. Es importante considerar que el docking y la dinámica predicen afinidad estructural o estabilidad del complejo, pero no garantizan consecuencias funcionales, como la degradación, activación o inhibición de la proteína blanco (105).

Además, realizamos una medición de Syk total y esto no permite detectar cambios en su estado de activación (generalmente medido por fosforilación en Tyr352 o Tyr525/526). Es posible que la interacción *in vitro* entre GP63 y Syk ocurriera, pero que no resultara en una modificación detectable de la proteína total, es posible que GP63 haya cortado solo una fracción de Syk, insuficiente para alterar el total detectable por citometría o que la concentración de GP63 fuese insuficiente. Así pues, consideramos que debe evaluarse la fosforilación funcional de la proteína Syk bajo el efecto de la proteína GP63 adicionada exógenamente o por expresión intracelular a futuro, para sustentar experimentalmente esta interacción.

5.5 Resumen de los hallazgos:

- I. Los estudios de acoplamiento molecular iniciales entre GP63 y Syk revelaron una interacción bioquímica y física muy favorable con un Z-score HADDOCK de -0.1 kcal/mol, destacando el puente de hidrógeno entre el (E) Glu265 de GP63 y Lys394 de Syk, crucial por su proximidad al centro activo de la proteasa y su coincidencia con el sitio de clivaje postulado.
- II. Las simulaciones de dinámica molecular confirmaron la estabilidad y robustez del complejo GP63 : Syk WT a lo largo de 200ns en condiciones fisiológicas, manteniendo interacciones clave entre residuos y un RMSD medio de aproximadamente 2.5 Å, lo que indica una unión sólida.
- III. La mutación E265A en GP63 resultó en un cambio conformacional significativo que impidió la correcta interacción de los residuos de Syk en el sitio catalítico, con una posible disminución en su función proteolítica.

6.0 CAPÍTULO 2

OBJETIVO ESPECÍFICO: Producir la proteasa GP63 recombinante y establecer un sistema de expresión constitutiva de la proteasa en líneas celulares humanas.

6.1 MARCO TEÓRICO

6.1.1 Producción de proteínas recombinantes

La producción de proteínas recombinantes es una herramienta fundamental en la investigación biomédica, la industria farmacéutica y la biotecnología. Esta tecnología permite la expresión controlada de genes de interés en sistemas celulares, facilitando el estudio funcional de proteínas. Existen diversos sistemas de expresión: bacterianos, levaduras, insectos, libres de células y mamíferos. Estas últimas se destacan por su capacidad de realizar modificaciones postraduccionales complejas, como glicosilaciones (106), plegamiento correcto y formación de enlaces disulfuro, fundamentales para mantener la funcionalidad y estabilidad estructural de las proteínas (107) (Tabla 4).

En nuestro proyecto seleccionamos el uso de células mamíferas, porque GP63 contiene una glicosilación importante en el centro activo, y requeríamos que no solo se plegara bien, sino que fuera funcionalmente activa. En otras plataformas se ha hecho la expresión de la proteína y esta no ha sido lo suficientemente robusta para recrear su función natural inmunomoduladora (108–111).

6.1.2 Células CHO y Células HEK

Las líneas celulares CHO (Chinese Hamster Ovary) y HEK293 (Human Embryonic Kidney 293) son ampliamente utilizadas como modelos para expresión de proteínas recombinantes. CHO se caracteriza por su alta capacidad de crecimiento en medios libres de suero y adaptabilidad a cultivos en biorreactores, lo cual la convierte en la

principal plataforma para producción industrial de fármacos proteicos. Las HEK293, por su parte, permiten una transfección eficiente y una expresión transitoria robusta, ideal para estudios de investigación básica. Sin embargo, ambas líneas presentan limitaciones: las CHO pueden generar patrones de glicosilación distintos al humano, mientras que HEK293, al ser de origen tumoral, puede tener expresión basal elevada de ciertas vías de señalización (107,112).

6.1.3 Células primarias y su susceptibilidad a transfección/transducción

La transfección es la introducción no viral de ácidos nucleicos (DNA, RNA y proteínas) en células mediante métodos físicos (como electroporación) o químicos (como liposomas). Suelen tener alta eficiencia en líneas transformadas, pero baja en células primarias. En contraste, la transducción implica el uso de vectores virales para transferir información genética, ofreciendo una mayor eficiencia y estabilidad de expresión de las proteínas, especialmente en células difíciles de modificar. El uso de lentivirus permite una integración estable del material genético en el genoma del hospedero (113,114) .

Las células primarias, derivadas directamente de tejidos, presentan una fisiología más representativa del contexto *in vivo*. No obstante, su manipulación genética resulta un desafío debido a su baja eficiencia de transfección y limitada capacidad proliferativa. La transducción viral, especialmente mediante lentivirus, ha demostrado ser más eficaz en estos modelos celulares, permitiendo la inserción estable de genes incluso en células no proliferativas como neuronas o LT y LB (115).

Tabla 4 Sistemas de Expresión de Proteínas Recombinantes

Modelo	Aplicación común	Ventajas	Desventajas
Bacteria 	Ensayos funcionales Análisis de estructura Producción de anticuerpos Interacciones entre proteínas	✓ Bajo costo ✓ Escalable ✓ Cultivo con requerimientos simples	• Solubilidad de la proteína • Puede requerir optimización especial para cada proteína • Dificultad en la expresión de proteínas de mamíferos
Levadura 	Ensayos funcionales Análisis de estructura Producción de anticuerpos Interacciones entre proteínas	✓ Procesamiento eucariota de proteínas ✓ Escalable hasta la fermentación (Gramos por litro) ✓ Requisito de medios simple	• Se requiere fermentación para alto rendimiento • Las condiciones de crecimiento requieren optimización
Algas 	Estudio de la fotosíntesis, biología de plantas, lípidos y metabolismo Ingeniería genética Producción de biocombustibles	✓ Modificaciones genéticas y expresión de sistemas para microalgas fotosintéticas ✓ Control experimental para biocombustibles, nutraceuticos y producción química especial ✓ Optimizado para selección y expresión robusta	• Tecnología reciente, en crecimiento • Menos desarrollada en comparación con otras plataformas
Insectos 	Ensayos funcionales Análisis de estructura Producción de Proteínas intracelulares Expresión de proteínas complejas Interacciones entre proteínas Producción de virus	✓ Similar a cultivos en células mamíferas ✓ Puede ser utilizados en cultivos estáticos o en suspensión	• Cultivos con condiciones más demandantes que en eucariotas • La producción de vectores tipo baculovirus consumen mucho tiempo
Mamíferos 	Ensayos funcionales Análisis de estructura Producción de anticuerpos Expresión de proteínas complejas Interacciones entre proteínas Producción de Bio-fármacos	✓ Alto nivel de procesamiento ✓ Puede producir proteínas de forma estable o transitoria ✓ Sistema robusto optimizado de producción de proteínas de alto rendimiento	• Rendimiento de gramos por litro únicamente en cultivos en suspensión • Condiciones de cultivo más exigentes
Libre de células 	Producción de proteínas tóxicas Incorporación de aminoácidos o marcadores no naturales Detección de inhibidores de la traducción Interacciones entre proteínas.	✓ Sistema abierto, disponible para componentes no naturales ✓ Expresión rápida ✓ Formato simple	• Se obtienen únicamente cantidades de miligramos y no es costo efectiva

6.1.4 Terapia génica con lentivirus

Actualmente, están en evaluación nuevas opciones terapéuticas de terapia génica (116–118). Entre los sistemas de entrega de material genético basados en virus, están disponibles los Retrovirus, Lentivirus, Adeno-Asociado virus AAV, Herpes virus, Poxvirus entre otros. La plataforma más utilizada es la del Lentivirus, por su capacidad de infectar tanto células en división como células en reposo y por su capacidad de integrar material genético en el genoma de la célula huésped, lo que permite una expresión a largo plazo de los genes insertados (22). Los vectores lentivirales están basados en el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), pero son modificados para eliminar genes virales patogénicos y mejorar su seguridad. Están compuestos por elementos esenciales como: la señal LTR (long terminal repeat), el sitio de empaque (ψ), los elementos RRE (Rev response element), cPPT (central polypurine tract) y WPRE (woodchuck hepatitis virus post transcriptional regulatory element), que aumentan la eficiencia de expresión y estabilidad del ARN mensajero (Figura 10,11) (21,119).

6.1.5 Tipos de lentivirus y pseudotificado

Los vectores lentivirales se han modificado y optimizado ampliamente durante tres generaciones, con el fin de mejorar la seguridad del vector, evitando la replicación no controlada, reduciendo el riesgo de mutagénesis insercional, donde la integración del ADN viral puede interrumpir genes esenciales del huésped (Figura 11) (22,32).

La primera generación incluía genes virales casi completos, lo que implicaba mayores riesgos de recombinación. La segunda generación eliminó genes accesorios como *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef*, y separó los elementos esenciales en distintos plásmidos, aumentando la seguridad. Finalmente, la tercera generación, la más usada actualmente, separa aún más los elementos virales en cuatro plásmidos: uno

que codifica el gen de interés (plásmido de transferencia con LTRs y señal Ψ), otro con las proteínas estructurales *gag* y *pol*, un tercero con el gen *rev*, y un cuarto con la proteína de envoltura (generalmente VSV-G) (120,121). Esta división reduce la posibilidad de generar virus replicativos y permite una producción eficiente de partículas virales capaces de integrar transgenes de forma estable en células blanco, incluso en estado no proliferativo. Los adelantos apuntan al fenopificado del vector, es decir, modificar proteínas de la envoltura viral, típicas como gp120, por otras (VSV-G, BaEV, RD114, H&F y NV) que facilitan la unión de ellas a unos receptores específicos expresados en la membrana de las células que faciliten la transducción de todo tipo de células, quiescentes, las células madre hematopoyéticas (HSC), subpoblaciones de LB y LT, en especial células LB y LT sin estimular y CD34+ (122–124). Por último, hasta el momento no se han descrito aproximaciones experimentales ni farmacéuticas, que involucren la dosificación de GP63 con fines terapéuticos inmuno moduladores, seríamos el primer reporte con esa connotación.

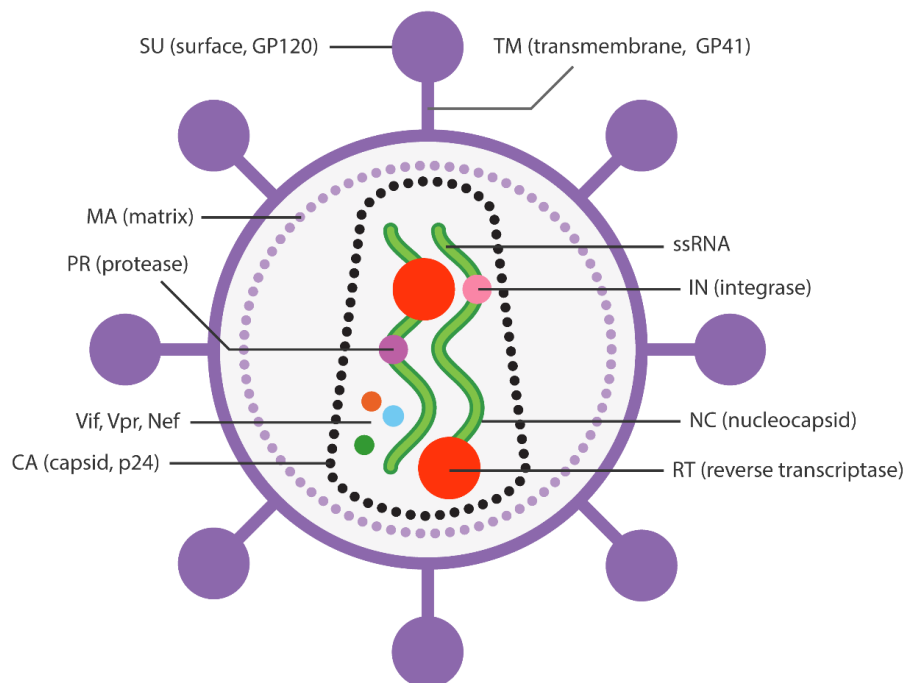
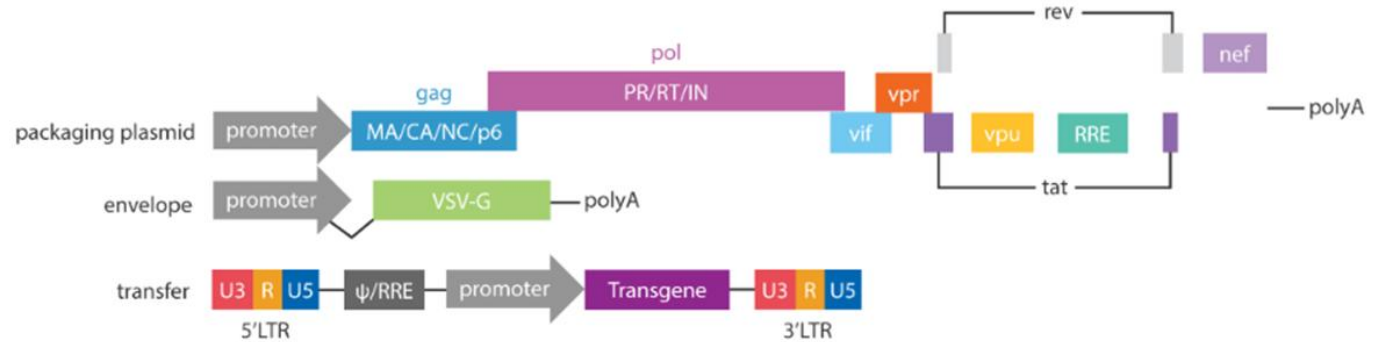
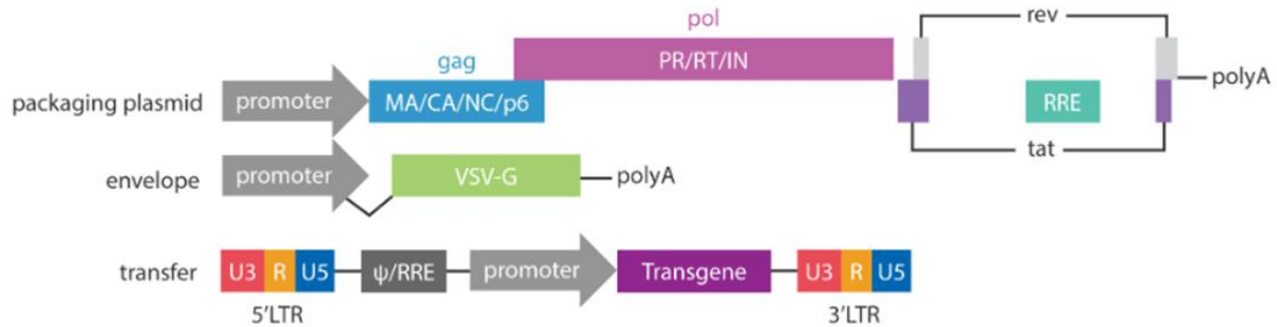


Figura 10 Partes de un lentivirus (Tomado de: *Applied Biological Materials* (125)).

Primera generación



Segunda generación



Tercera generación

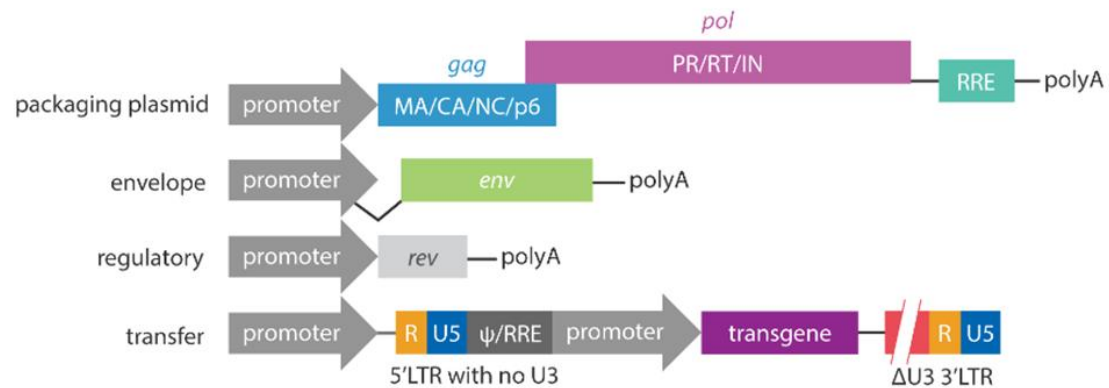


Figura 11 Generaciones y genes de un lentivirus (Tomado de: Applied Biological Materials) (125).

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1 Cultivo de líneas celulares humanas

6.2.1.1 Cultivo Linfocitos B Ramos

La línea celular Ramos (RA-1) ATCC® CRL-1596™, derivada de linfoma de Burkitt humano, se cultivaron en medio de cultivo RPMI 1640 (1X) (Gibco) con 1% de Penicilina 100U/ml / Estreptomicina 100µg/ml (Sigma) y suplementado con 20% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco). Cada dos días se realizó conteo celular por cámara de Neubauer, para confirmar que la confluencia celular no fuera superior a 1×10^6 células/mL para mantener la viabilidad celular. Para los ensayos de transfección *in vitro*, las células fueron cultivadas en suspensión en frascos de 25 cm² con medio RPMI completo y posteriormente incubadas a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂ durante 24 a 48 horas.

6.2.1.2 Cultivo Linfocitos T Jurkat

Los Linfocitos T Jurkat (E6-1) ATCC® TIB-152™ derivados de leucemia de LT humanas (LT CD4+), se cultivaron en medio de cultivo RPMI 1640 (1X) (Gibco) con 1% de Penicilina 100U/ml / Estreptomicina 100µg/ml (Sigma) y suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco). Cada dos días se realizó conteo celular por cámara de Neubauer, para confirmar que la confluencia celular no fuera superior a 1×10^6 células/mL para mantener la viabilidad celular. Para los ensayos de transfección *in vitro*, las células fueron cultivadas en suspensión en frascos de 25 cm² con medio RPMI completo y posteriormente incubadas a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂ durante 24 a 48 horas.

6.2.1.3 Cultivo Monocitos THP-1

Los monocitos de la línea celular (THP-1 ATCC®) derivados de leucemia monocítica aguda, se cultivaron en medio de cultivo RPMI 1640 (1X) (Gibco) con 1% de Penicilina 100U/ml / Estreptomicina 100µg/ml (Sigma) y suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) en suspensión. Cada dos días se realizó conteo

celular por cámara de Neubauer, para confirmar que la confluencia celular no fuera superior al 1×10^6 células/mL para mantener la viabilidad celular. Para los ensayos de transfección *in vitro*, monocitos THP-1 fueron dispuestos en placas de 6 pozos con medio RPMI completo, e incubadas durante 24 horas a 37°C en una atmósfera con 5% CO₂.

6.2.1.4 Cultivo adherente HEK293T

La línea celular HEK293T (293T/17) ATCC® CRL-11268™, derivada de células embrionarias de riñón humano modificadas con el gen SV40 T-antígeno, fue cultivada en Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), 1 % Penicilina 100U/ml / Estreptomicina 100µg/ml (Sigma) y cultivadas a 37 °C con 5 % de CO₂. El cultivo se realizó en frascos de cultivo tratados para adherencia, monitoreando la confluencia celular a diario por microscopía invertida de luz. Al alcanzar una confluencia de (>85%) fueron desprendidas y re suspendidas mediante tratamiento con tripsina al 0.25 % por 30seg a 37°C, seguida de neutralización con medio completo. Se realizó conteo celular por cámara de Neubauer, para confirmar que la confluencia celular no fuera superior a 1×10^6 células/mL para mantener la viabilidad celular. Para los ensayos de transfección *in vitro*, se utilizaron dos aproximaciones de cultivo descritas más adelante.

6.2.1.5 Cultivo adherente HEK293-GPR

Las células HEK293-GPR (GPRTC) son una línea celular optimizada para la producción de lentivirus. Es modificada para expresar de forma estable los genes de gag, pol, rev y la proteína VSV-G de forma constitutiva. Se cultivaron en frascos de cultivo con pretratamiento de adherencia, con medio IMDM suplementado con 10 % FBS y como protección antimicrobiana se adiciona Primocin (50mg/ml Invivogen® [100µg/mL]); a una temperatura de a 37 °C con 5 % de CO₂ en condiciones de extrema esterilidad. Se monitoreó la confluencia celular cada 24-48h por microscopía invertida de luz. Al alcanzar una confluencia de (>85%) para su pase se desprenden, mediante tratamiento con tripsina al 0.25 % por 30 seg a 37°C,

seguida de neutralización con medio completo. La metodología de los ensayos de transfección *in vitro*, con finalidad de producir lentivirus se describe más adelante.

6.2.2 Producción de la proteína GP63 recombinante.

6.2.2.1 Plásmidos

Para la expresión de la proteína GP63 se adquirieron los plásmidos con el transgene de GP63 disponibles en la plataforma Addgene (<https://www.addgene.org/>); estos plásmidos, ya habían sido utilizados por otros investigadores.

El primer plásmido adquirido fue el D5_Ld_280600 / #135821, posteriormente se adquirió el Lmajor_gp63_10_0460_WT / #171640 para expresar la proteína nativa o wild type y otro que codifica para una proteína mutada, inactiva funcionalmente Lmajor_gp63_10_0460_E265A / #171641. Este último plásmido tiene un cambio del ácido glutámico por una alanina en la posición 265 (E265A), y sirvió como control funcional de la proteína y su función inmunomoduladora puesto que carece de actividad en el centro activo de la proteína (Tabla 5). En adición, se generó un nuevo constructo mediante clonación, por efecto de la digestión con las enzimas BamHI y NotI se extrajo el fragmento codificante para *gp63* (WT y mt) de los plásmidos L. major_gp63_100460_WT y L. major_gp63_100460_E265A respectivamente. El DNA se amplificó y se ligó al vector pHL20 MND que previamente había sido cortado con las mismas enzimas de restricción (BamHI y NotI). Posterior a la clonación, con el fin de comprobar el tamaño final del constructo, orientación del inserto e integridad, se cortó el gen *gp63* con otras enzimas de restricción (EcoRV y Pvu), obteniendo un patrón igual al predicho en MacVector (Software).

Posteriormente, se realizó secuenciación de los plásmidos confirmando la fidelidad de la secuencia del inserto, sin mutaciones, ni deleciones accidentales; pero si la confirmación de la mutación puntual del plásmido (*gp63 mt*) de su versión mutante. Finalmente, se amplificaron y purificaron los constructos obteniendo 1.5µg/µL de DNA plasmídico el cual se conservó bajo refrigeración a -15°C hasta su uso.

Tabla 5 Plásmidos para la expresión de GP63 (Addgene)

Nombre	Plásmido	Propósito	Deposita	Inserto	Uso	Tags	Expresado	Mutación	Promotor
<i>D5_Ld_280600</i>	# 135821	Expresión de de GP63 de <i>L. donovani</i>	Gavin Wright	GP63 Ectodominio (<i>L. donovani</i>)	Producción de proteína recombinante	Biotinylación + His-tag	Mamífero	Ninguna (WT)	CMV*
<i>Lmajor_gp63_10_0460</i> <i>WT</i>	# 171640	Expresión de GP63 <i>L. major</i> en mamíferos	Dennis Ko	GP63 (<i>L. major</i> , WT)	Producción y ensayos funcionales	Myc-His (C-terminal)	Mamífero	Ninguna (WT)	CMV*
<i>Lmajor_gp63_10_0460</i> <i>E265A</i>	# 171641	Expresión de GP63 inactiva catalíticamente (E265A)	Dennis Ko	GP63 (<i>L. major</i> , mt) (E265A)	Ensayo de función catalítica	Myc-His (C-terminal)	Mamífero	E265A (mutación puntual)	CMV*

*CMV (Citomegalovirus)

6.2.2.2 Producción de la proteína GP63 en el sistema ExpiCHO™ Expression System.

Inicialmente, la proteína GP63 fue producida mediante expresión transitoria en células ExpiCHO-S™, este es un sistema optimizado para altas tasas de expresión en células de mamífero (126). Para ello, se utilizó el kit ExpiCHO™ Expression System (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Las células ExpiCHO-S fueron cultivadas en medio ExpiCHO™ Expression Medium, a 37 °C, 8 % de CO₂ y agitación constante a 125 rpm, hasta alcanzar una densidad celular óptima ($6-8 \times 10^6$ células/mL). Posteriormente, se transfectaron con el plásmido D5_Ld_280600 / #135821 que codifica la secuencia de GP63 fusionada a un dominio de purificación (His-tag) utilizando el reactivo de transfección ExpiFectamine™ CHO. A las 18–24 horas post transfección, se añadieron los potenciadores del sistema (ExpiCHO™ Enhancer y Feed), para maximizar la producción proteica. La expresión se monitoreó durante 5, 7 y 14 días, tras lo cual se recolectó el sobrenadante del cultivo por centrifugación ($3000 \times g$, 10 min) y se conservó junto con el pellet en refrigeración hasta su uso.

6.2.3 Producción de la proteína en GP63 en células HEK293T ATCC® CRL-11268™

6.2.3.1 Pretratamiento de flask para cultivo adherente con revestimiento de matrix extracelular (ECM coatings)

Los frascos para la producción de la proteína a gran escala fueron pretratados con una solución que favorece la adherencia de las células y que se conserve la confluencia deseada del 80-90%. Esta solución se preparó con 500ml de agua ultrapura precalentada, 1.32gr de Gelatina, 2,5gr de L-Lysina (Monohidrochloride [0.5%], 2,5 de L-Arginina (Monohidrochloride) [0.5%], se mezcla en plancha calentadora e imantada. Luego se adiciona suavemente 5 ml de glicerol [1%] y se mezcla hasta que se vea transparente. Finalmente, se filtra con bomba al vacío en cabina de bioseguridad y se mantuvo en refrigeración hasta su uso. En cada cultivo adherente realizado, se trataron los frascos con 5-10ml de esta solución por 1 hora

en cabina de bioseguridad. Luego se descartó el exceso quedando una capa que recubre las paredes del frasco.

6.2.3.2 Transfección de células HEK293T para producción de la proteína GP63

La proteína recombinante GP63 fue expresada a gran escala de forma transitoria en células HEK293T (ATCC® CRL-11268™). Las células fueron cultivadas en medio Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), 1 % de penicilina/estreptomicina, cultivadas a 37 °C con 5 % de CO₂ en condiciones de adherencia. Para producir la proteína se sembraron 10x10⁶ células totales por flask de 75cm² hasta alcanzar una confluencia del >85 %.

Cuando ya se contaba con la confluencia suficiente, se preparó el reactivo PEI (polietilenimina) lineal de 25KDa, en medio libre de suero y antibióticos Opti-MEM™ Gibco™, a una proporción de 3:1 (PEI : DNA) con DNA plasmídico a una concentración de 90µg de DNA por flask. Con la solución preparada (PEI-DNA 5mL) y disuelta en 10 ml de medio completo, se reemplaza el medio de cultivo completo con el que crecían las células. Finalmente, se incubaron durante 24, 48, 72 y 96 horas, para permitir la expresión óptima de la proteína. Al término de cada punto temporal se colectó el medio y se reemplazó con uno fresco sin PEI ni DNA. El sobrenadante colectado fue centrifugado a 3000 × g por 10 minutos para eliminar células y residuos y se preservó en refrigeración hasta su uso. Este mismo protocolo se realiza tanto para la proteína WT como mutante (Anexo 6).

6.2.3.3 Ensayo paralelo de seguimiento de viabilidad celular (HEK293T)

En paralelo se transfectaron células HEK293T con GP63 a menor escala, con la finalidad de evaluar la viabilidad celular. Teniendo en cuenta que los flask de 175cc se colectaría el sobrenadante y las células sólo serían recuperadas al final del experimento (96h), para estos ensayos se utilizaron placas de 6 pozos con 1x10⁶ células totales por pozo. Se cultivan en medio IMDM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de penicilina/estreptomicina, cultivadas a 37°C con 5% de CO₂ en condiciones de adherencia, hasta alcanzar una confluencia del >85 %.

Cuando ya se contaba con la confluencia suficiente, se preparó el reactivo PEI (polietilenimina) lineal de 25KDa, a una proporción de 3:1 (PEI:DNA) en medio libre de suero y antibióticos OPTI-MEM. Con esa solución preparada (800µL) y disuelta en 7200µL de medio completo, se reemplaza el medio de cultivo (2ml por pozo) y se incubaron durante 24, 48, 72 y 96 horas, en paralelo a su ensayo en flask de 175. Al término de cada punto temporal se colectó el medio y se recolectaron las células. El sobrenadante fue centrifugado a $3000 \times g$ por 10 minutos para eliminar células y residuos y se preservó en refrigeración hasta su uso. Las células fueron lavadas con 2ml de PBS 1x en dos ocasiones para retirar el medio y así poder desprenderlas mediante tratamiento con tripsina.

La viabilidad del cultivo se evaluó con el marcador 7AAD por citometría de flujo en un FACSCalibur (Becton Dickinson), también se cuantificó la proteína GP63 expresada a nivel intracelular a las 24, 48, 72 y 96 horas post transfección. Esto se realizó, inicialmente con el anticuerpo anti-His-Tag (APC anti-His Tag Antibody clone J095G46) y posteriormente con el anticuerpo anti-GP63 (*Leishmania Major* Surface Protease gp63 antibody 96/26 isotipo IgG2a de Biorad).

6.2.3.4 Tratamiento de los Pellets (Sedimentos)

Los pellets o sedimentos obtenidos post centrifugación, de los cultivos de producción de la proteína en HEK293T durante 96 horas, fueron lavados con PBS y congelados hasta posterior su uso. Luego, se descongelaron con la finalidad de obtener los extractos proteicos totales, utilizando mPER™ Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific), con el protocolo descrito por el fabricante. El volumen de lisis se ajustó al tamaño del pellet (aproximadamente 100–200 µL por 1×10^6 células). La mezcla fue incubada durante 10–15 minutos a 4 °C con agitación suave para favorecer la disrupción celular. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a $14,000 \times g$ por 10 minutos a 4 °C para eliminar restos insolubles. El sobrenadante que contenía las proteínas solubles fue recolectado y almacenado a –80 °C hasta la purificación, y análisis por SDS-PAGE o Western blot. La

concentración proteica se cuantificó mediante el kit (His-Tag ELISA Detection Kit de GenScript (Cat. No. L00436)), siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.2.3.5 Purificación y Calidad de la proteína GP63

Los sobrenadantes recolectados tras la expresión de GP63 con su His-Tag fueron centrifugados para eliminar restos celulares y posteriormente la proteína fue purificada mediante cromatografía de afinidad usando columnas (HisPur™ (Ni-NTA) spin purification Kit Pierce), aprovechando la presencia de la etiqueta His₆ en la proteína recombinante. Los sobrenadantes fueron incubados con la resina incluida en la columna y tras lavados con un buffer con una concentración muy baja de imidazol (para eliminar proteínas inespecíficas), se realizó la elución de la proteína GP63-His con un buffer con alta concentración de imidazol (250–500 mM). Las fracciones eluidas, fueron posteriormente concentradas utilizando columnas (Vivaspin 20, 20mL Prot 30KDa # VS2021) de filtración por corte molecular de 30 KDa, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las proteínas concentradas fueron almacenadas a –80 °C hasta su análisis posterior.

La calidad y pureza de la proteína recombinante GP63, se evaluaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) bajo condiciones desnaturalizantes. Se cargaron alícuotas de las fracciones obtenidas durante la purificación en un gel al 10–12 %, y tras la separación, las proteínas fueron reveladas mediante tinción con azul de Coomassie.

6.2.3.6 Cuantificación de la proteína GP63 recombinante

La detección cuantitativa de la proteína recombinante GP63 se realizó mediante un ensayo tipo ELISA competitivo utilizando el kit His-Tag ELISA Detection Kit de GenScript (Cat. No. L00436). Las muestras, controles y el Anti-His Monoclonal Antibody (50µL de c/u), fueron incubados en placas previamente recubiertas con anticuerpos específicos para la etiqueta His₆, se esperó la competición por el tag fusionado en la proteína GP63 permitiendo su captura. Tras lavados para eliminar material no unido, se añadió un anticuerpo secundario conjugado a HRP (Antibody Tracer). La señal se desarrolló mediante la adición del sustrato TMB Solution, y la

reacción se detuvo con solución ácida (Stop Solution). La absorbancia (OD) se midió a 450 nm en un lector de microplacas. La cuantificación se realizó comparando con una curva estándar incluida en el kit, y los resultados se expresaron como concentración de GP63 His-Tag en ng/mL.

6.2.4 Sistema de expresión constitutiva de la proteína GP63.

6.2.4.1 Producción del lentivirus GP63

En la estrategia experimental del objetivo específico 2, está contenida la información sobre los plásmidos con el gene para GP63 (pHL20 MND GP63 WT) y (pHL20 MND GP63 MT), estos plásmidos fueron diseñados con la propiedad, de no solo poder hacer la transfección para la expresión transitoria en HEK293T, sino que también se podía utilizar para la producción de un lentivirus (LV-MND-GP63 WT) para expresión de la proteína nativa, o el plásmido (LV-MND-GP63 MT) para la proteína mutada.

El plásmido transgene se suministra a las células GPRTC (HEK293-GPR), optimizadas para la producción de lentivirus, expresando de forma constitutiva todos los genes para la conformación estructural del lentivirus, sin necesidad de utilizar 3 o más plásmidos por separado, como se realiza regularmente. Se cultivaron a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂ y al transcurrir 48 horas se empezó a colectar el medio IMDM con el lentivirus, manteniéndolos en refrigeración y cada 24 horas adicionales se volvía a colectar el medio, hasta completar 5 días. Finalmente, el medio se concentró por ultra centrifugación y se alícuota hasta su titulación.

Se trata de un vector tipo SIN (self-inactivating) de tercera generación, pseudotipado con la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G). Cuyo promotor tiene al gen eucariota MND (Myeloproliferative sarcoma virus enhancer–dl587rev–negative control region–deleted) es un promotor ampliamente utilizado en vectores lentivirales, deriva de la región U3 del LTR del retrovirus Moloney murino (MoMLV), modificado mediante la adición del “enhancer” del virus del sarcoma mieloproliferativo, eliminando la región reguladora negativa dl587rev. Este promotor

tiene la ventaja que proporciona altos niveles de expresión sin incrementar el riesgo de mutagénesis por inserción. El promotor MND es una opción robusta cuando se busca una expresión fuerte, sostenida y segura en múltiples tipos celulares (120).

Este vector lentiviral se nombró (LV-MND-GP63WT o LV-MND-GP63mt), con los que se realizaron las transducciones en líneas celulares linfoides y mieloides. El MOI (Multiplicidad de infección) utilizado en cada infección viral, se calculó para cada experimento, para determinar el número de partículas virales sobre un número de células así:

$$MOI = \text{Número de partículas virales} / \text{Número de células diana}$$

Ejemplo: Si se desea infectar un cultivo que contiene 1×10^6 células utilizando 2×10^6 partículas virales, el MOI sería de 2, calculado como $MOI = 2 \times 10^6 / 1 \times 10^6 = 2$. Esto indica que, en promedio, cada célula recibiría dos partículas virales. No obstante, es importante aclarar que la distribución real de las partículas virales entre las células no es uniforme, sino que sigue una distribución estadística de Poisson. Esto significa que algunas células no serán infectadas, otras recibirán una partícula, y algunas podrían recibir múltiples partículas virales durante el proceso de transducción.

6.3 RESULTADOS CAPÍTULO 2.0

6.3.1 Producción de la proteína recombinante GP63 WT/mt

6.3.1.1 Producción de GP63 recombinante en células CHO: dificultades en el diseño del plásmido y purificación no específica.

Para el primer ensayo de producción de la proteína recombinante se utilizó un sistema transitorio de células CHO (Chinese Hámster Ovary) kit ExpiCHO. Estas células fueron transfectadas con el plásmido D5_Ld_280600, codificante para la proteína GP63 (WT) fusionado con una etiqueta de His-tag en el extremo C-terminal. Luego de colectar el sobrenadante y pellet celular, se realiza la purificación y detección de la proteína; observando unas bandas electroforéticas en los geles de SDS-PAGE (entre 70-50KDa) que podrían coincidir con el tamaño esperado de la proteína recombinante (Figura 12A). Sin embargo, estas bandas estaban presentes en todas las condiciones analizadas, incluyendo el control positivo de transfección, el cual expresaba una proteína totalmente diferente (un anticuerpo tipo IgG); lo que sugiere que estas bandas corresponden a proteínas endógenas de las células CHO o a productos inespecíficos de la transfección (Figura 12A).

Durante la purificación con las columnas de níquel, se esperaba capturar la proteína a través de su His-Tag. Sin embargo, al analizar nuevamente el SDS-PAGE de las alícuotas obtenidas en cada uno de los pasos de la purificación, como el “Flow through” FT, los lavados W y la elución final E; se identificaron bandas positivas en los pasos iniciales (FT y W) y no como se esperaba en la elución, tras la liberación de la proteína capturada por la columna (Figura 12B). Para comprobar si había proteína en las soluciones, se hizo un Western Blot (WB) para detección del His-Tag en GP63; se emplearon nuevos controles positivos de proteínas conocidas con His-Tag para validar la eficiencia y especificidad del WB. El resultado fue inespecífico en nuestras muestras, observando bandas positivas en los controles negativos, y en los carriles esperados no hubo positividad. Concluyendo que, si la

proteína GP63 producida no expresaba el His-Tag o no había sido efectiva la transfección y no había GP63 recombinante. También, que el método de identificación de la proteína (WB) podría no ser el ideal, tal vez por tener una sensibilidad menor a concentración de la proteína producida. Por lo tanto, las bandas inespecíficas observadas serían proteínas endógenas de las células CHO presentes en todas las condiciones (Figura 12D).

Posteriormente, al analizar el plásmido *in silico* observamos que tiene reportada la inclusión del His-Tag en el mapa, pero al secuenciar no se detectan los aminoácidos que codifican para esta estructura. Por lo tanto, sin el tag no sería posible purificar la proteína por esa metodología. En adición, la secuencia obtenida del plásmido no tuvo concordancia en el alineamiento, en regiones como la secuencia señal y el pro-péptido, lo que podría afectar claramente la producción de la proteína, identificación y purificación adecuada (Anexo 2).

Con la incertidumbre acerca del plásmido y la imposibilidad de detectar a GP63 con un anticuerpo específico para la proteína en ese momento, se procede a la adquisición de nuevos plásmidos verificados y se cambia la plataforma de expresión, para evitar proteínas contaminantes con el mismo peso molecular de GP63.

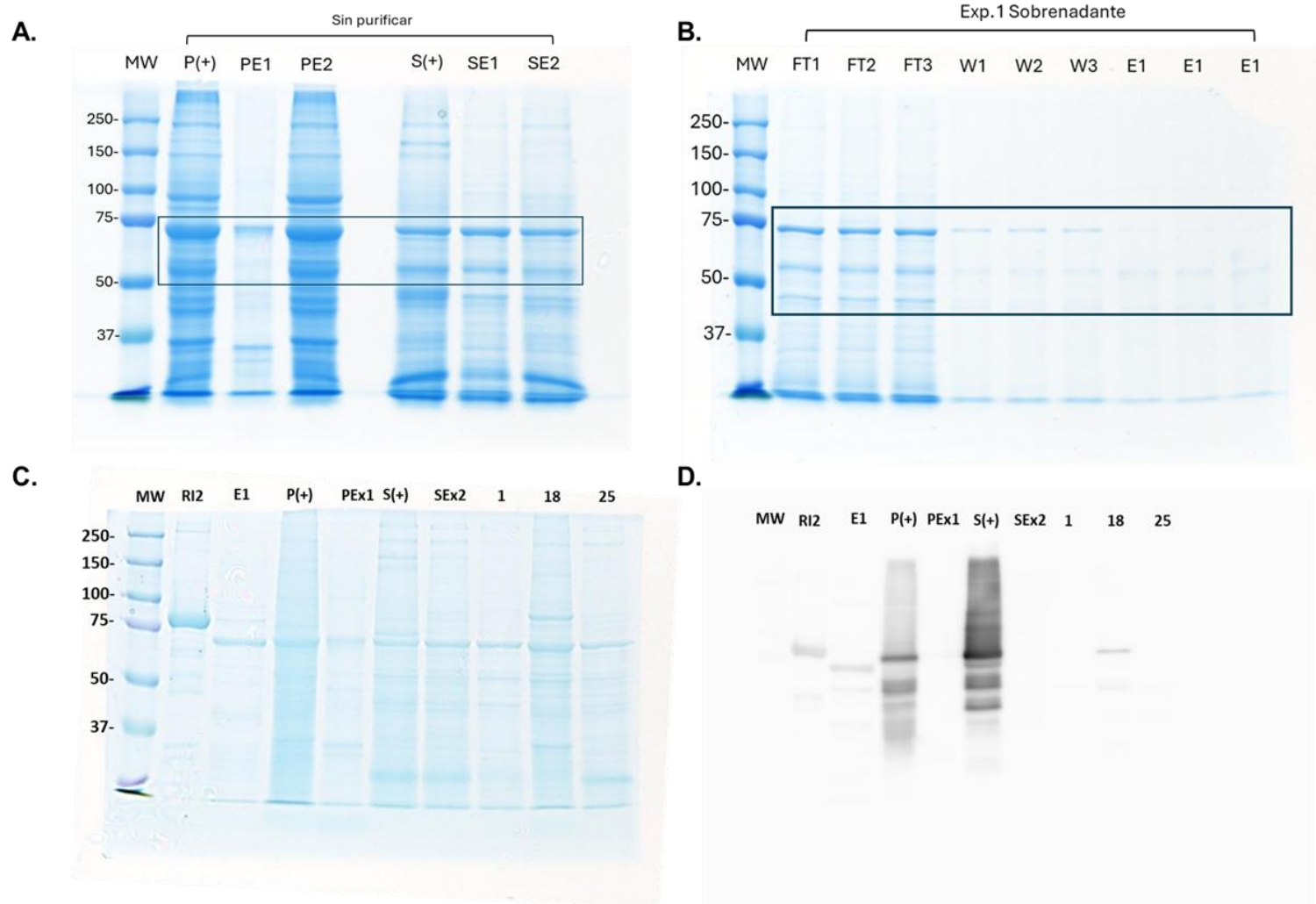


Figura 12 SDS-PAGE y Western Blot: Limitaciones técnicas con el sistema de expresión en células CHO.

Identificación de interferencias endógenas y errores en la construcción del plásmido que conducen a la inespecificidad para la detección de la proteína GP63. Geles de SDS-PAGE con tinción de azul de comassie. **A)** Muestras post cultivo sin purificar y (MW) marcador de peso molecular (250KDa-10KDa), control positivo de transfección expresión de IgG pellet (P+) y sobrenadante (S+), ensayos 1 y 2 de producción de GP63 condiciones de pellet (PE1-2) y sobrenadante (SE1-2). **B)** Alícuotas sobrenadante post purificación con columna de afinidad, Flow through (FT), lavados (W), elución (E1). **C)** Gel para identificación de His-Tag, 2 controles His-Tag positivos las retro transcriptasas RI2 de 98KDa y E1 de 62KDa, el pellet del control positivo de transcripción experimental IgG (P+), pellet del ensayo 1 de GP63 (Pex1), sobrenadante del control positivo de transcripción IgG, muestras al azar de Flow through y lavados. **D)** WB anticuerpo anti His-Tag (dil 1:1000) secundario (1:10.000) 5 segundos de exposición.

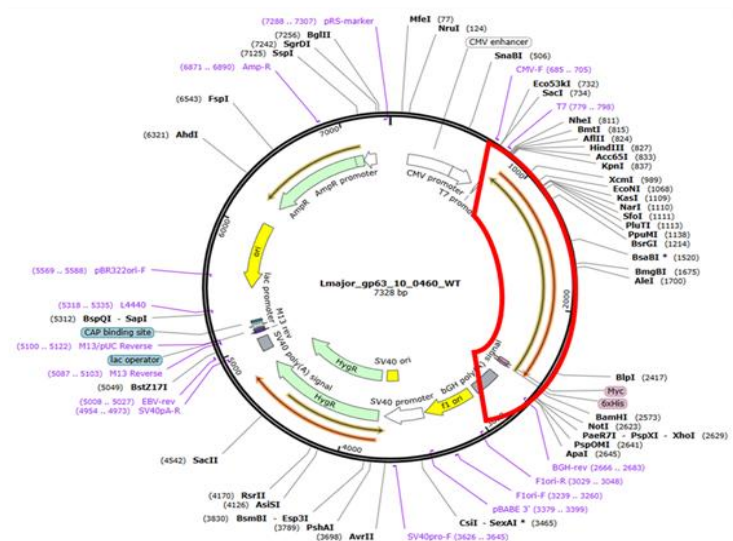
6.3.1.2 Construcción y validación de un nuevo plásmido/transgene estandarizado para la producción de la proteína GP63.

Se generó un nuevo constructo mediante clonación, cuya secuencia fue verificada y contiene todas las regiones necesarias para la correcta obtención de la proteína GP63, por transfección o por su uso como transgene en la construcción de un lentivirus. Por efecto de la digestión con las enzimas BamHI y NotI se extrajo el fragmento de *gp63* (WT y mt) de los plásmidos L. major_gp63_100460_WT y L. major_gp63_100460_E265A respectivamente (Figura 13 A-B). El DNA se amplifica por PCR y se liga al vector pHL20 MND que previamente había sido cortado con las mismas enzimas de restricción (BamHI y NotI) (Figura 13 C-D).

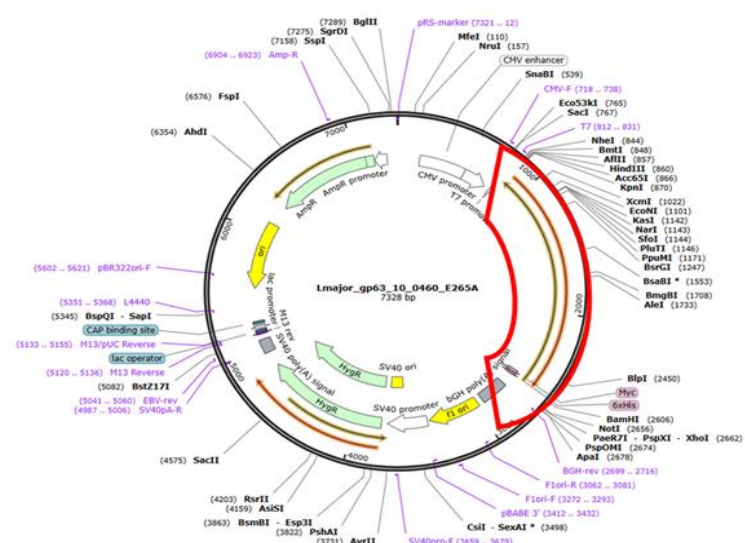
Los análisis en gel de agarosa muestran un patrón de bandas que coincide con la inserción esperada del fragmento (Figura 13 E). Además, con el fin de comprobar el tamaño final del constructo, orientación del inserto e integridad, se cortó el gen *gp63* con otras enzimas de restricción (EcoRV y Pvu), obteniendo un patrón igual al predicho en MacVector (Software) (Figura 13 F). Posteriormente, se realizó secuenciación de los plásmidos confirmando la fidelidad de la secuencia del inserto, sin mutaciones o deleciones accidentales; pero si la confirmación de la mutación puntual del plásmido (*gp63 mt*) de su versión mutante (Figura 13 G). Finalmente, se amplificaron y purificaron los constructos obteniendo 1.5µg/µL de DNA plasmídico para los experimentos futuros.

Estos resultados validan la eficiencia del procedimiento de corte, purificación, ligación y transformación; obteniendo clones recombinantes adecuados para su uso en la producción de la proteína GP63, de forma transitoria en diferentes células mamíferas, o el uso de este plásmido en la producción de un lentivirus codificante para GP63 intracelular.

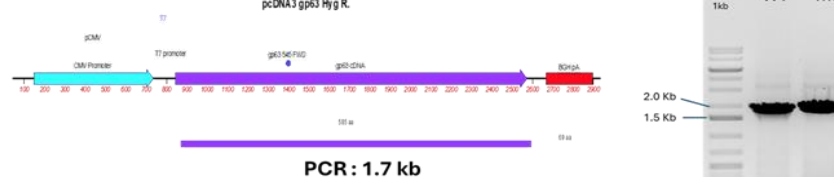
A. L. major_gp63 WT



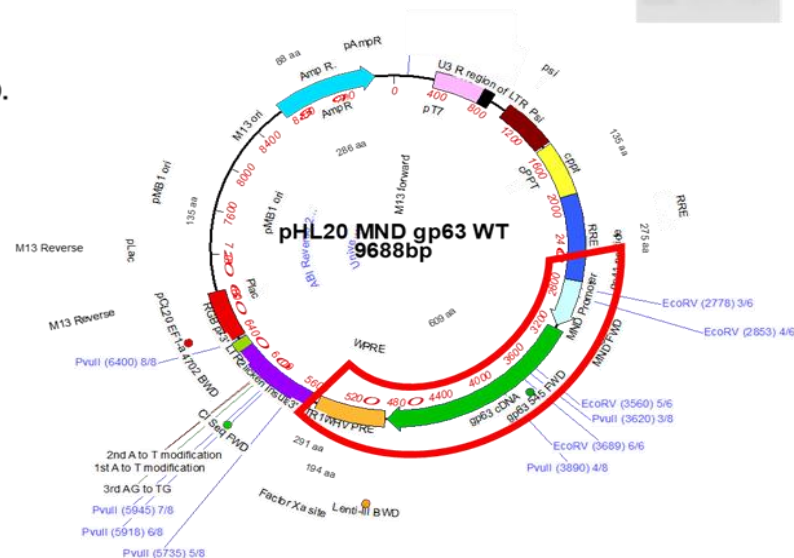
B. L. major_gp63 MT E265A



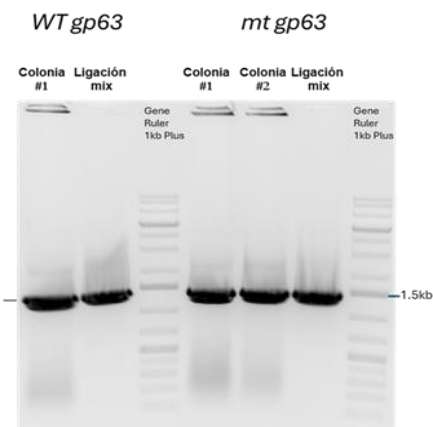
C.



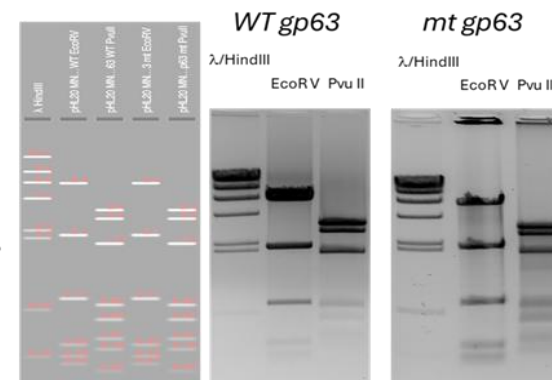
D.



E.



F.



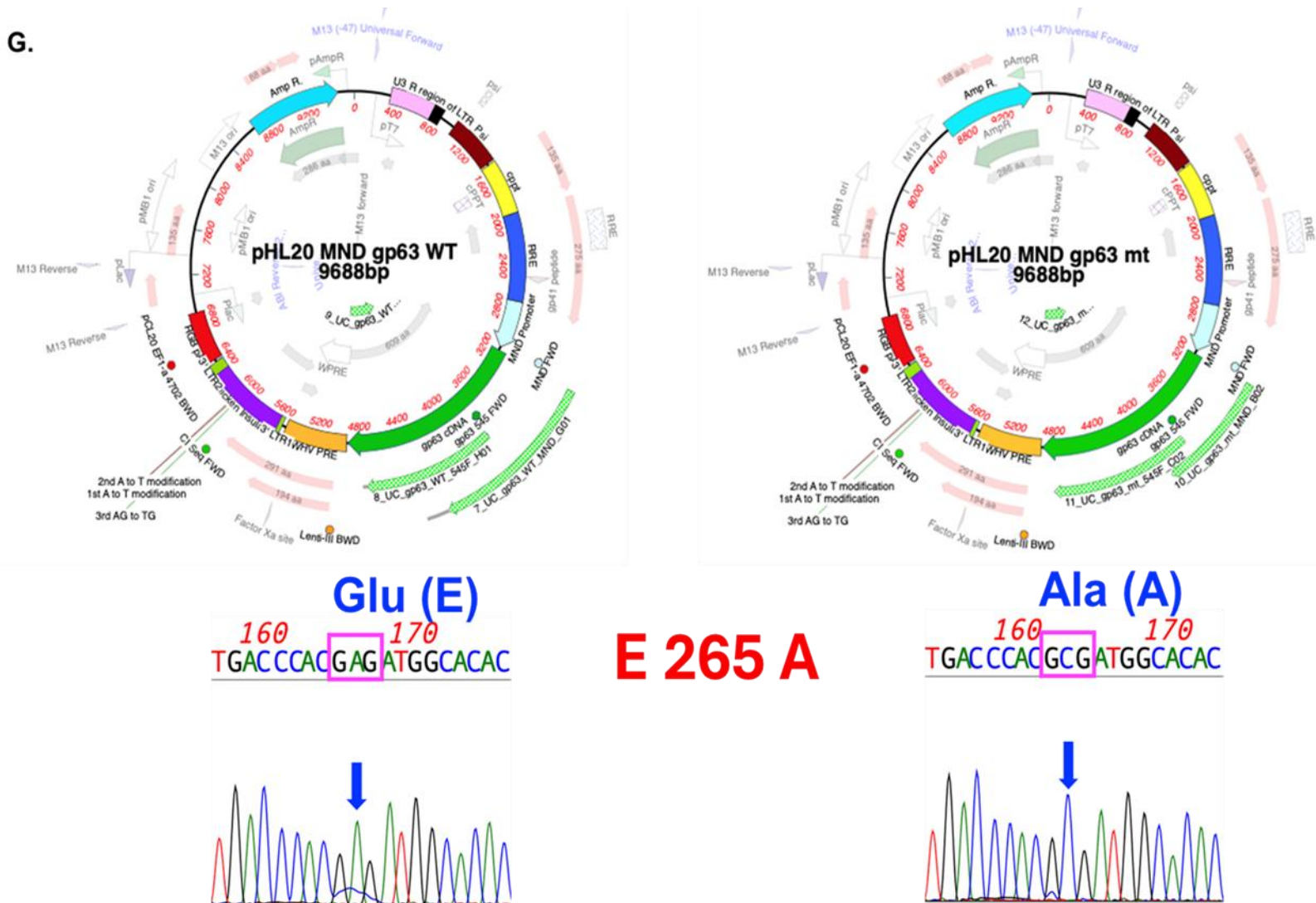


Figura 13 Representación esquemática de la construcción del plásmido para expresión de GP63.

Mapas de los plásmidos. **A)** Representación circular del plásmido que contiene el gen *gp63* nativo (WT) resaltado en rojo. **B)** Representación circular del plásmido que contiene el gen *gp63* mutante (mt) E265A resaltado en rojo. **C)** Plásmido linealizado zona gen *gp63* y gel de corte con las enzimas BamHI y NotI bandas para WT y mt. **D)** Plásmido final pHL20 MND con el inserto de *gp63*, se muestra solo el ejemplo WT, para el mutado es lo mismo solo cambia la mutación E265A. **E)** Gel de agarosa de la ligación. **F)** Gel de los cortes en las enzimas de restricción EcoRV y Pvu II sobre la mitad del gen *gp63*. **G)** Confirmación por secuenciación Sanger de la inserción del gen *gp63* en el plásmido final y confirmación de la mutación E265A.

6.3.1.3 La transfección de las líneas celulares linfoides (LB Ramos, LT Jurkat) y mieloide (THP-1) no ofrecen buena eficiencia de transfección y producción de proteínas recombinantes.

Células de las líneas Ramos, Jurkat y THP-1 fueron transfectadas con el plásmido (pHL20 MND GP63 WT/mt) y 5 días post transfección se evaluó el porcentaje de población positiva por citometría de flujo. A pesar de realizar la transfección bajo condiciones estandarizadas, los niveles de transfección fueron subóptimos en las tres líneas celulares, con una eficiencia que no superó el 38% de positividad para el His-Tag de GP63, obtenido en LB Ramos. Se realizó seguimiento cada 48 horas y los resultados fueron consistentes hasta 21 días después, lo que sugiere una baja capacidad de estas líneas para incorporar o expresar el constructo, limitando por completo futuros análisis funcionales en esas poblaciones (Figura 14).

Este fenómeno podría deberse a la naturaleza intrínsecamente resistente de estas líneas celulares a los métodos convencionales de transfección, o bien a una baja expresión sostenida del vector en el tiempo (115). Esta limitación se ve acentuada por la reducción en la viabilidad celular observada tras la transfección, especialmente marcada en la línea THP-1 cuando se utilizó el plásmido codificante para la variante mutante de GP63 (Figura 14).

Las células en suspensión, como los LB Ramos, suelen requerir métodos de transfección más eficientes y menos citotóxicos, como la nucleofección (por ejemplo, el kit AMAXA V), para lograr una incorporación efectiva del material genético (127). No obstante, al emplear esta metodología con el plásmido codificante para la proteína GP63 WT, se obtuvieron eficiencias de transfección de apenas un 20%, resultados que siguen siendo subóptimos (Anexo 3). Ante esta limitación, se optó por utilizar una línea celular adherente, con mayor capacidad de captación de ADN y adecuada para métodos de transfección más simples y económicos, como el uso de polietilenimina (PEI).

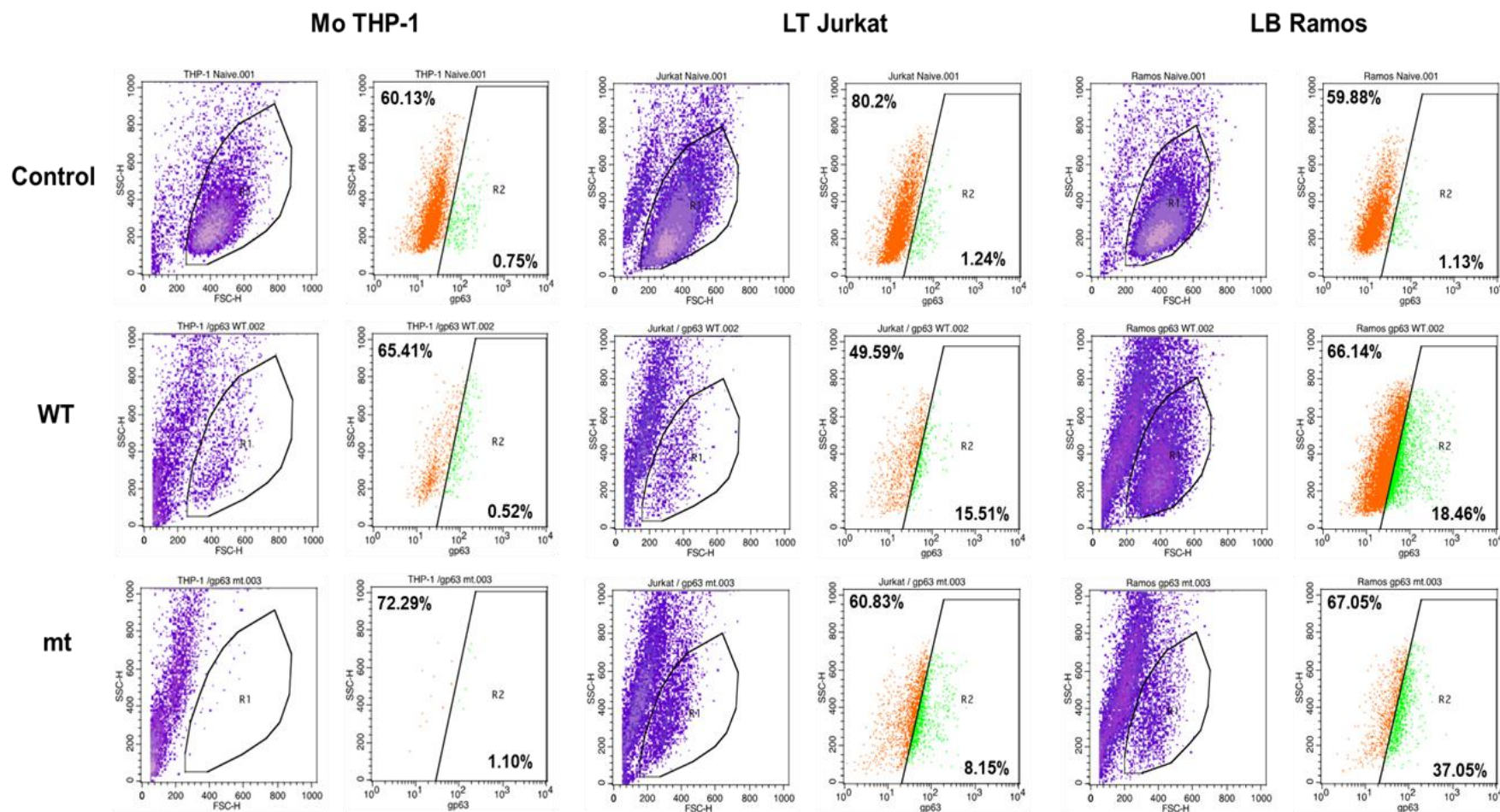


Figura 14 Transfección de las líneas celulares THP-1, LT Jurkat y LB Ramos con plásmido codificante para la proteína GP63 nativa (WT) y mutante (mt).

Niveles de transfección. La detección de GP63 intracelular se realiza por citometría de flujo con anticuerpo anti His-Tag. Las células fueron cultivadas a temperatura de 37°C y 5% de CO₂ en medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 10%, los datos graficados corresponden al día 5 de cultivo. Observamos una transfección subóptima en todas las células y con evidente viabilidad reducida en especial para los monocitos THP-1 (panel izquierdo). Los Linfocitos T Jurkat (centro) y Linfocito B Ramos (panel derecho) toleran la transfección, sin alcanzar niveles satisfactorios de GP63. Condiciones evaluadas: células sin estímulo o **Control**, **WT** GP63 estado nativo, **mt** GP63 mutado.

6.3.1.4 Las células HEK293T expresan de forma transitoria la proteína GP63 hasta 72 horas post transfección.

Las células HEK293T fueron inicialmente transfectadas con los plásmidos codificantes para GP63 en sus versiones WT y mutante (mt), con el objetivo de evaluar la eficiencia de incorporación del DNA plasmídico y la viabilidad celular. Los resultados demostraron que estas células son altamente susceptibles al proceso de transfección, alcanzando tasas de positividad superiores al 60%, con un 70.7% para la condición WT y un 80.7% para la variante mutante (Figura 15). Estos niveles de expresión fueron detectados 48 horas post transfección mediante citometría de flujo, utilizando un anticuerpo dirigido contra la etiqueta His-Tag de GP63, lo cual permitió confirmar la expresión intracelular de la proteína y la funcionalidad de los plásmidos previamente construidos.

Los resultados fueron consistentes hasta 7 días después de la transfección, conservando un nivel superior al 60% de detección de GP63. Sin embargo, de forma particular se observa una disminución en la viabilidad de las células. Por lo tanto, se requiere un seguimiento al cultivo desde el momento de la transfección.

Con la finalidad de producir la proteína recombinante GP63 WT y/o mt, para purificarla y cuantificarla, se realizaron transfecciones a gran escala esperando un alto rendimiento y masificación de la proteína. En simultáneo, se realizaron otros cultivos, en un volumen inferior, pero con las mismas condiciones experimentales, con el propósito de monitorear la viabilidad celular. La proteína se colectó cada 24 horas, se filtró y purificó por columna de tamaño y afinidad.

Encontramos que la concentración máxima de GP63 detectada por ELISA anti His-Tag, fue de aproximadamente 20 ± 3 ng/mL a las 24 horas post transfección, alcanzando un máximo de 30 ng/mL a las 48h y que disminuye de forma tiempo dependiente (Figura 16 A). El número total de células en el cultivo fue aumentando de forma discreta con el paso del tiempo, a las 24, 48 y 72 horas se contaron 2 o 3 generaciones más (4×10^6 células/mL) con respecto a las células que iniciaron el

cultivo (1×10^6 células/mL). No obstante, a las 96 horas el número de células totales se reduce a 2×10^6 células/mL (Figura 16 B). Este hallazgo coincide con los valores de viabilidad celular que se mantuvieron hasta las 72h en un 80%, y que a las 96h disminuye en un 50% la sobrevivencia del cultivo por el crecimiento normal celular (Figura 16 C).

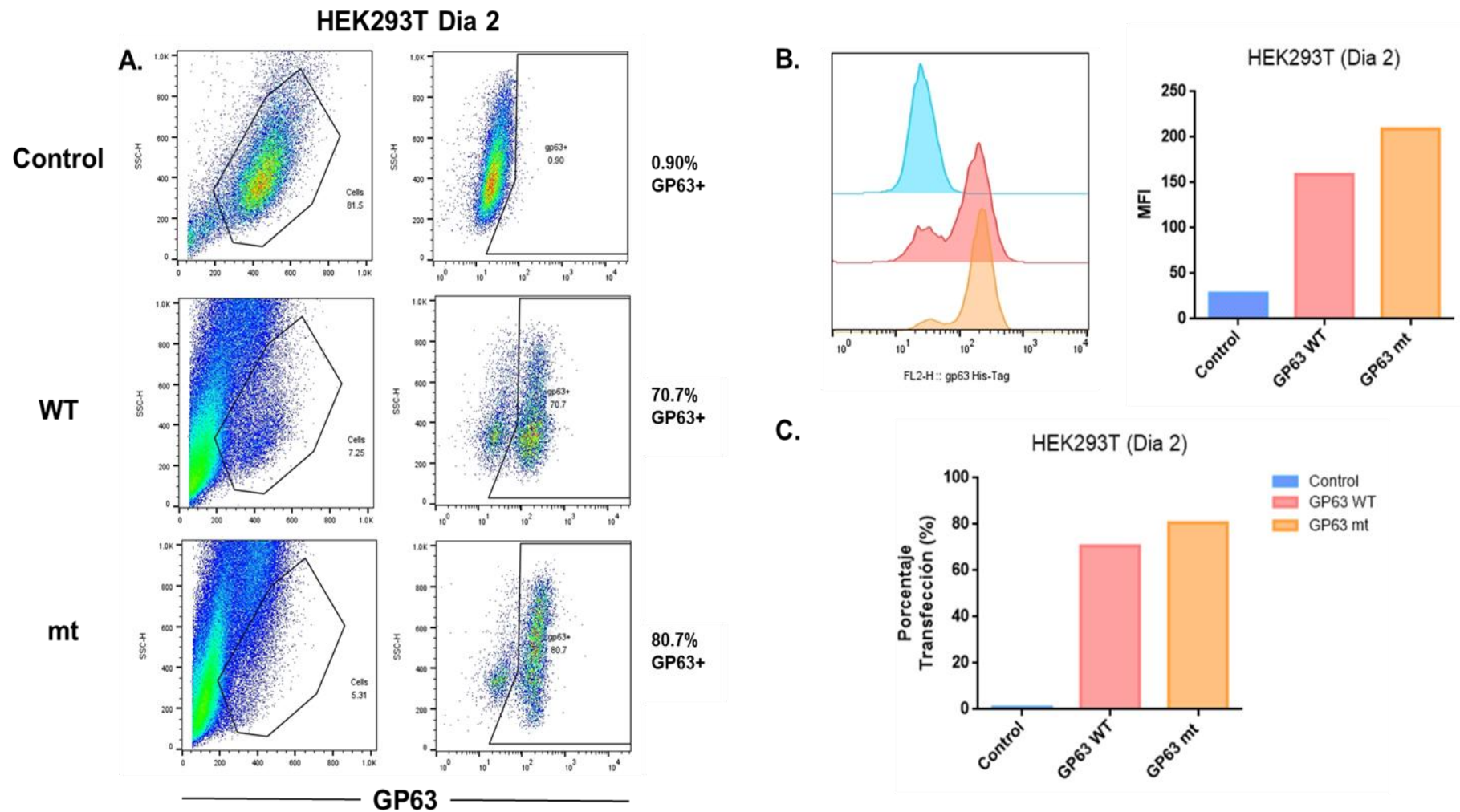


Figura 15 Las células HEK293T producen GP63 recombinante 48h post transfección con pHL20 MND *gp63* WT/mt.

Niveles de transfección. **A)** La detección de GP63 intracelular se realiza por citometría de flujo con anticuerpo anti His-Tag. Las células fueron cultivadas a temperatura de 37°C y 5% de CO₂ en medio IMDM suplementado con SFB al 10%, los datos graficados corresponden al día 2 (48h) de cultivo. Observamos una transfección adecuada alcanzando niveles >60% de transfección. Hay evidente viabilidad reducida en especial con GP63 mutante. **B)** Histograma e intensidad media de fluorescencia MFI de la detección de anti His-Tag en GP63. **C)** Porcentaje de transfección. Condiciones experimentales: células sin estímulo o Control, transfección con *gp63* WT estado nativo, transfección con *gp63* mt mutado.

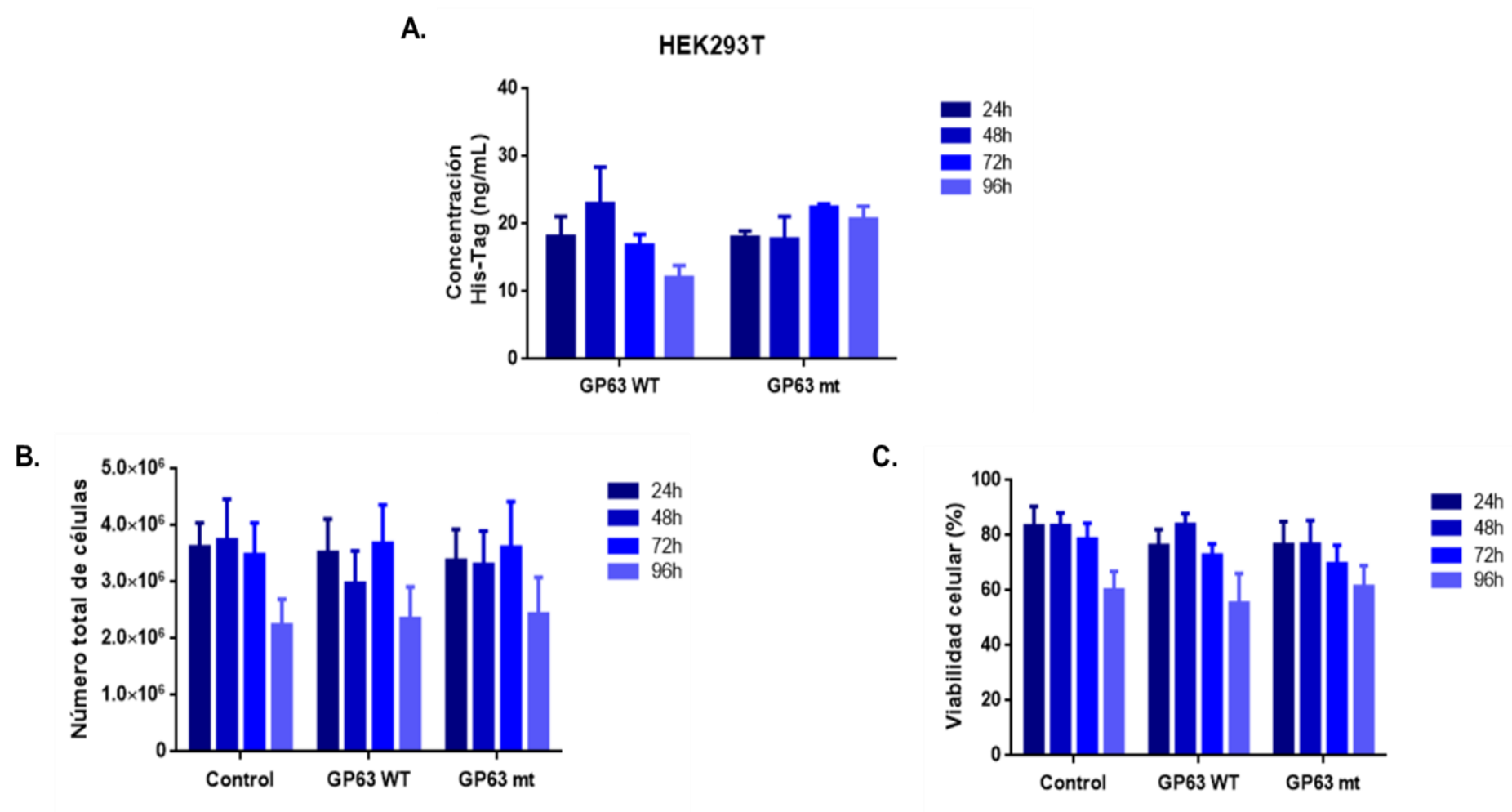


Figura 16 La concentración de GP63 recombinante 48 horas post transfección es inferior a la esperada.

Cuantificación de la proteína GP63 por ELISA anti His-Tag. **A)** Evolución temporal de la concentración de GP63 (ng/mL) (n=6) **B)** Conteo celular de HEK293T durante 4 días. **C)** Porcentaje de viabilidad celular. Las condiciones B y C se realizan con azul de tripán en cámara de Neubauer y confirmado con contador celular automático, los datos representan (n=4) réplicas biológicas.

La concentración de la proteína recombinante GP63 obtenida en los cultivos de células HEK293T fue considerablemente inferior a la esperada, incluso cuando se realizó producción a gran escala. La disminución progresiva de la viabilidad celular observada en paralelo sugiere que la baja recuperación podría deberse a una inhibición de la plataforma de expresión o a un posible efecto citotóxico inherente a la naturaleza metaloproteasa de GP63. Aunque no se descarta cierta pérdida de proteína durante el proceso de purificación, los sobrenadantes fueron cuantificados antes y después de la concentración, así como tras la purificación, manteniéndose una relación proporcional entre las mediciones. A pesar de los bajos niveles de recuperación, se lograron recolectar alícuotas de GP63 recombinante (WT y/o mutante), las cuales fueron conservadas para su uso en ensayos funcionales posteriores.

6.3.2 Producción del lentivirus LV-MND-GP63 WT/mt

6.3.2.1 Generación de un vector lentiviral en células GPRTC para la expresión de GP63

Se llevaron a cabo dos ensayos de producción de lentivirus, en los cuales las células GPRTC fueron transfectadas con los plásmidos pHL20 MND gp63, tanto en su variante WT como mt. Posteriormente, las células fueron cultivadas durante cinco días, recolectando el sobrenadante cada 24h bajo condiciones de estricta esterilidad.

En el primer ensayo se obtuvieron 500 mL de medio IMDM conteniendo lentivirus codificantes para GP63, los cuales fueron concentrados 500 veces, alcanzando una titulación viral determinada por qPCR de 1×10^8 partículas virales por mililitro (equivalente a 15 millones de partículas virales en 1 mL de solución). Los lentivirus producidos, tanto en su forma WT como mt, fueron utilizados para evaluar su capacidad de transducción en células B de la línea Ramos. Durante la medición del número de copias del vector por célula (VCN), se observó que el lentivirus mutante

no logró una transducción efectiva en comparación con el control estándar. En las condiciones evaluadas con multiplicidades de infección (MOI) de 2 y 5, analizadas en los días 5 y 8 post transducción, el VCN se mantuvo por debajo de 1, indicando menos de una copia por célula. En contraste, el lentivirus WT mostró una transducción eficiente, con un VCN de 5.6 al día 2 con MOI 2, y un VCN de 11 al día 2 con MOI 5, resultados que reflejan una integración óptima del vector.

En la segunda producción de lentivirus se recolectaron 500 mL de medio, los cuales no fueron concentrados, manteniéndose a una dilución 1x, con una titulación viral de 1×10^5 partículas virales por mililitro (100.000 partículas/mL). Este lote de lentivirus fue alicuotado y empleado en transducciones destinadas a ensayos funcionales, dado que la expresión intracelular de GP63 podría inducir citotoxicidad. Por esta razón, se optó por utilizar títulos virales bajos con el fin de minimizar la muerte celular prematura.

6.4 DISCUSIÓN CAPÍTULO 2

En las últimas décadas, se han desarrollado distintas estrategias para la producción de GP63 recombinante en diferentes sistemas de expresión, con el fin de caracterizar su estructura, su función enzimática e investigar la inmunogenicidad de dicha proteína.

Los primeros estudios se enfocaron en sistemas procariotas como *Escherichia coli* (*E. coli*), tal como lo reportaron Handman et al. en 1990 y posteriormente Button et al. en 1991. Si bien estos sistemas permitieron una producción abundante de la proteína, las formas recombinantes carecían de modificaciones postraduccionales necesarias para su correcto plegamiento, resultando proteínas insolubles o funcionalmente limitadas (108,128,129). En 1993, Button et al. expresaron GP63 en un sistema de *Baculovirus*, eliminando la región de anclaje a la membrana (GPI) y modificando la señal de secreción, para obtener una forma secretada activable con agentes como el cloruro de mercurio (HgCl_2), alcanzando rendimientos de producción hasta de 1 mg/L de proteína (111).

Posteriormente, en 2001, Shaebani et al. lograron la expresión de GP63 en la levadura *Pichia pastoris*, obteniendo una forma secretada con actividad gelatinasa y una estructura glicosilada más cercana a su configuración nativa. Los autores reportaron una expresión superior al 30 % del total proteico, aunque sin conversión a unidades absolutas (mg/L), lo que indica una producción eficiente, pero con limitaciones en la cuantificación precisa del rendimiento (130). Sin embargo, no fue sino hasta el estudio de Roberts et al. 2022, cuando se produjo una versión de GP63 en un sistema de células mamíferas, permitiendo un patrón de glicosilación más compatible con la forma nativa del parásito (131). Este avance fue seguido por los trabajos del grupo del Dr. Dennis Ko, quienes expresaron versiones WT y mutantes mt de GP63 también en células mamíferas, con el objetivo de estudiar su actividad sobre la quemoquina CXCL10 (48,83). Si bien las otras plataformas de producción

son más baratas, fáciles de manipular, y las proteínas muestran cierta actividad, estas sirven más como antígenos que como agentes bioactivos (42).

El uso de células mamíferas para producir proteínas recombinantes permite alcanzar una conformación tridimensional y un perfil de glicosilación más cercano a la forma funcional de GP63, lo cual es fundamental para la fiabilidad de los ensayos de interacción estructural y funcional (132,133) . Este trabajo de tesis se sitúa en esta línea de avance, utilizando GP63 recombinante expresada en células mamíferas, tanto su versión WT o nativa, como mutante (mt); así que contar con dos versiones de la proteína facilitó el análisis comparativo de su actividad catalítica y sus efectos inmunobiológicos sobre los LB.

La producción y purificación de la proteína recombinante GP63 presentó desafíos significativos; inicialmente en células CHO, debido al uso de un plásmido defectuoso, que no contenía la etiqueta His-tag esperada y mostraba inconsistencias en regiones clave, como la secuencia señal y el pro-péptido. Estas deficiencias, arrojaron resultados ambiguos, con presencia de bandas electroforéticas inespecíficas y la imposibilidad de purificar y detectar la proteína GP63 con el His-tag, mediante cromatografía de afinidad y Western Blot, respectivamente.

Para superar estas limitaciones, se realizó un proceso riguroso de diseño y validación de nuevos plásmidos. Se generó un nuevo constructo mediante clonación, cuya secuencia fue verificada en incluir todas las regiones necesarias para la correcta obtención de GP63, confirmando la confiabilidad del inserto y la presencia de la secuencia His-tag.

A pesar de que se intentó expresar la proteína, por transfección en las mismas células diana (líneas celulares Ramos, Jurkat y THP-1), estas mostraron una baja eficiencia de transfección (valores subóptimos) sin superar el 38% de positividad y una marcada disminución en la viabilidad celular. Sin embargo, logramos producir la proteína en células HEK293T, una plataforma eficiente y susceptible para la

expresión transitoria de GP63 recombinante. En estas células se alcanzaron niveles de transfección superiores al 60% de positividad, permitiendo la expresión de la proteína y confirmando la integridad de los plásmidos contruidos. No obstante, al cuantificar la producción a gran escala de GP63 en células HEK293T, encontramos concentraciones considerablemente inferiores a lo esperado (máximo 30ng/mL de GP63), y se observó una disminución progresiva de la viabilidad celular. Estos resultados podrían deberse, en primer lugar, a una posible inhibición de la plataforma de expresión: aunque las células mamíferas ofrecen un procesamiento postraducciona más fiel (como glicosilación y plegamiento adecuado), pueden presentar bajos niveles de secreción si no se optimizan adecuadamente las condiciones del sistema (134). En segundo lugar, la expresión de GP63 podría inducir citotoxicidad intrínseca debido a su naturaleza metaloproteasa, lo cual podría provocar muerte celular prematura o incluso el silenciamiento de su expresión (135,136). En tercer lugar, si la señal de secreción no es eficiente o no se acopla correctamente a la proteína, esta podría quedar retenida en compartimentos intracelulares o ser degradada antes de su liberación (137).

A pesar de que la producción de GP63 recombinante fue baja, su potencial biológico de metaloproteasa permite que a concentraciones reducidas sea funcional. Se ha demostrado que GP63 actúa catalíticamente, no estequiométricamente, por lo que una pequeña cantidad puede tener un efecto sostenido si hay múltiples contactos catalíticos. Otros estudios han reportado actividad biológica de ectodominios desde niveles tan bajos como 1–500 ng/mL (131). Adicionalmente, la expresión en células mamíferas, aunque menos eficiente, garantiza un procesamiento postraducciona más similar al de *Leishmania*, lo que puede conferir mayor funcionalidad a la proteína incluso en bajas cantidades.

Aunque existen diversos sistemas para producir GP63 recombinante, no se ha documentado ningún caso de uso de lentivirus para expresar GP63 de forma estable intracelularmente en células mamíferas. Así que implementar esta estrategia ofrece

una expresión de la proteasa novedosa y facilita estudios de función a largo plazo y generar modelos más robustos de interacción proteína–proteína.

Logramos establecer con éxito la producción de lentivirus codificante para GP63 WT, demostrando buenos niveles de transducción en LB Ramos, con un número de copias del vector por célula (VCN), significativamente superior al del lentivirus mutante, el cual no transducía las células eficazmente. Por esta razón el comparador en los ensayos funcionales fue el control sin estímulo y un control de transducción, con un lentivirus codificante para la proteína GFP.

Estas aproximaciones experimentales son cruciales, ya que proporcionan las herramientas genéticas y los sistemas de expresión, verificados y necesarios para futuros análisis funcionales y más detallados de la proteína GP63; a pesar de las optimizaciones posibles en el rendimiento de la producción proteica y la gestión de la viabilidad celular en cultivos a gran escala.

6.5 Resumen de Hallazgos:

- I. Inicialmente la producción de GP63 recombinante fue fallida debido a un plásmido defectuoso que carecía del His-tag y presentaba incongruencias en su secuencia, lo que impedía una purificación y detección adecuadas.
- II. Se generaron y validaron exitosamente nuevos constructos plasmídicos para GP63 (WT y mt) con secuencias verificadas, y se produjo lentivirus GP63 WT funcional que demostró buenos niveles de transducción en células LB Ramos.
- III. Las células HEK293T demostraron ser adecuadas para la expresión transitoria de GP63, aunque la producción de la proteína fue inferior a lo esperado y la viabilidad celular disminuyó con el tiempo, posiblemente debido a la toxicidad de GP63.

7.0 CAPÍTULO 3

OBJETIVO ESPECÍFICO: Evaluar el efecto inmunomodulador de la expresión de la proteína GP63 sobre moléculas linfocitos B *in vitro*.

7.1 MARCO TEÓRICO

7.1.1 Activación de los Linfocitos B (LB)

7.1.1.1 Activación T Dependiente

La activación T dependiente de los LB representa el mecanismo regulado para la generación de respuestas humorales específicas y duraderas. Consiste en un reconocimiento, señalización e inducción de la expresión génica de proteínas activadoras, seguida de una proliferación celular. Durante este proceso interactúan diferentes receptores con sus ligandos; el receptor del linfocito T (TCR) con el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHCII) con su respectivo péptido y las proteínas coestimuladoras como el CD28 con CD80/CD86. Mientras que en los LB el CD40 (138) tras la unión con su ligando CD40L (expresado en LT) inicia una cascada de diferenciación para ambas células, proporcionando señales de supervivencia y diferenciación (139). Más adelante, quinasas como BLK, SyK, ZAP70, Lck, son responsables de la fosforilación, de las proteínas que conducen la señal en la cascada de activación, dentro de los linfocitos (94,140,141). Lo que los vuelve blancos terapéuticos de interés para el control de la activación. Finalmente, todas esas señales, junto a citoquinas circundantes, inducen la activación completa del LB, promoviendo su proliferación clonal, el cambio de isotipo de inmunoglobulina, la maduración de afinidad en los centros germinales, y la diferenciación hacia células plasmáticas secretoras de anticuerpos o LB de memoria(142,143) .

7.1.1.2 Activación T Independiente

La activación T independiente permite a los LB responder directamente a ciertos tipos de antígenos sin requerir la cooperación de los LT. Este mecanismo es importante en la respuesta inmune contra patógenos, que tienen estructuras moleculares altamente repetitivas como el lipopolisacárido (LPS) bacteriano. Existen dos tipos principales de antígenos T independientes: Los del tipo 1 (TI-1) incluyen moléculas como los mitógenos policlonales, que pueden activar LB independientemente de la especificidad de su BCR a concentraciones altas, pero también pueden actuar de forma específica a bajas concentraciones. Los del tipo 2 (TI-2) son antígenos con estructuras repetitivas que entrecruzan múltiples BCR en la superficie de los LB, lo que conduce a su activación (144,145).

Este tipo de activación se caracteriza por presentarse a través del BCR y/o receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) como los receptores tipo Toll. Por ejemplo, el reconocimiento de CpG por TLR9 o LPS por TLR4, lo que genera una respuesta rápida, caracterizada principalmente por la producción de IgM, con cambio de isotipo limitado y generación reducida de memoria inmunológica. Sin embargo, esta respuesta es efectiva para la neutralización inicial de patógenos, especialmente en las mucosas. También, esta respuesta es importante en el mantenimiento de niveles basales de anticuerpos naturales que participan en la primera línea de defensa humoral (146,147) .

7.1.1.3 Señalización celular en LB

La señalización del LB inicia con la activación del receptor BCR al unirse al antígeno, el BCR está compuesto por una inmunoglobulina de membrana, asociada con los heterodímeros Igα/Igβ (CD79a/CD79b), que contienen los motivos de activación basados en tirosina (ITAMs) necesarios para la transducción de señales. Al reconocer un antígeno, se recluta y activa a la tirosina quinasa SyK. De forma paralela, los TLR como TLR4 y TLR9 al reconocer antígenos, activan la vía MyD88 que termina en la activación de NF-κB (144,148). Esta convergencia, potencia la expresión de genes involucrados en supervivencia, proliferación y producción de

citoquinas. Recientemente han tomado importancia las moléculas de la señalización en el campo de la terapéutica, formulando tratamientos dirigidos a modular esas cascadas de activación como por ejemplo el Fostamatinib, un medicamento inhibidor de Syk (spleen tyrosine kinase) . Esto demuestra el interés en las intervenciones de inmunoterapia dirigida al componente de señalización celular (24,149,150).

7.1.1.4 SyK y PKC

SyK es una quinasa de tirosina citoplásmica esencial en la señalización del BCR. Tras unirse a los ITAMs fosforilados por quinasas Src, se auto fosforila en residuos de tirosina de su dominio de activación, estabilizando su forma activa y potenciando su actividad. Una vez activada, fosforila sustratos como BLNK, PLC γ 2, Vav y subunidades de PI3K, conduciendo a la activación de PKC, que fosforila e inactiva I κ B, permitiendo la translocación nuclear de NF- κ B . La activación de Syk desencadena vías de señalización que regulan la reorganización del citoesqueleto para la sinapsis inmunológica y la migración celular (151,152), y promueve la supervivencia vía mTOR, integrando señales de activación con requerimientos biosintéticos.

Además, Syk activa vías MAPK como ERK1/2, JNK y p38, que controlan proliferación, diferenciación y respuesta al estrés, y fosforila factores de transcripción como NFAT, AP-1 y CREB, modulando genes como CD69, CD25 y ciertas citoquinas. Su desregulación puede conducir a proliferación descontrolada y transformación maligna, subrayando su papel en la homeostasis de los LB (95,153).

7.1.1.5 Vía TLR (Toll-like Receptor)

Los TLR4 y TLR9 son PRRs clave en los LB, que reconocen LPS bacteriano y secuencias CpG no metiladas de DNA bacteriano o viral, respectivamente. El TLR4, presente en la superficie y en compartimentos endosomales, reconoce PAMPs extracelulares e internalizados, y tras unirse al LPS recluta MyD88 y TRIF, activando

NF- κ B, AP-1 e IRF3; además puede actuar sinérgicamente con el BCR para potenciar la activación. El TLR9, expresado de manera constitutiva o inducible, reconoce DNA en endolisosomas ácidos, reclutando MyD88, IRAK1/4 y TRAF6, activando rutas similares a TLR4, pero con mayor inducción de IRF7 y producción de interferones tipo I. También promueve proliferación, diferenciación a células plasmáticas, producción de anticuerpos sin señales del BCR y altas cantidades de IL-6, IL-10 y TNF, junto con aumento de MHC II y coestimuladores. Su desregulación se asocia con enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico (145,154).

7.1.1.6 NF- κ B

El NF- κ B es un factor de transcripción clave en la activación, supervivencia y diferenciación de LB, formado por dímeros (p65/RelA, RelB, c-Rel, p50, p52) retenidos en el citoplasma por I κ B. Su activación ocurre por la vía canónica, inducida por BCR, TLRs y CD40, que implica fosforilación y degradación de I κ B α , permitiendo la translocación de p65/p50; y por la vía no canónica, activada por BAFF y CD40L, que usa NIK e IKK α para procesar p100 a p52 y formar RelB/p52 (155,156). Entre los genes inducidos figuran factores de supervivencia (Bcl-2, Bcl-xL, A1), citoquinas (IL-6, TNF), quemoquinas y moléculas como CD40 y CD80/86. NF- κ B es esencial para la diferenciación a células plasmáticas mediante Blimp-1. GP63 modula este factor clivando p65/RelA y generando una forma truncada que altera la respuesta inmune, favoreciendo la supervivencia de *Leishmania* en células mieloides (56).

7.1.1.7 Secreción de IgM en LB

La IgM es la primera inmunoglobulina secretada en su forma soluble tras la activación, lo que representa la primera línea de defensa humoral. La transición de la forma de membrana a la forma soluble está mediada por eventos de empalme y corte del mRNA, lo que permite su secreción efectiva al medio extracelular (157). En los LB vírgenes se encuentra en su forma monomérica unida a la membrana, actuando como el receptor de antígenos (BCR), luego post activación se secretan las formas pentaméricas, que tienen alta avidéz por el antígeno, por los múltiples

sitios de unión (158). La secreción requiere la expresión del gen alternativo (exón secretor), que codifica la región carboxilo terminal específica para la forma soluble (sIgM), en lugar de la región transmembranal. Este cambio es regulado por factores de corte y empalme como E2A, PTB y hnRNPs.

En el retículo endoplasmático, las cadenas μ y las ligeras se ensamblan en forma de monómeros y luego se unen dando forma pentaméricas, para esto es esencial la proteína J (joining chain). Ya ensamblada se transfiere al aparato de Golgi donde es glicosilada, se empaqueta en vesículas que se fusionan con la membrana plasmática y se libera el pentámero al espacio extracelular (159,160). Esta versión secretada del anticuerpo también es fundamental en la vía clásica del complemento, y se detecta en el suero en etapas muy tempranas de una infección. La IgM natural secretada de forma constitutiva por los linfocitos B1 tiene un papel adicional en la homeostasis inmune y la eliminación de células apoptóticas (142,161).

7.1.1.8 Marcadores funcionales de LB

7.1.1.9 CD19

El CD19 es una glicoproteína transmembrana que, junto con CD21, CD81 y CD9, forma un complejo correceptor del LB que amplifica las señales iniciadas por el BCR. Se expresa desde el estadio pro-B hasta células plasmáticas, aunque disminuye en la diferenciación terminal. Su cola citoplásmica contiene residuos de tirosina fosforilados por quinasas Src, que sirven como puntos de anclaje para PI3K, Vav y otras moléculas de señalización. CD19 reduce el umbral de activación del BCR, permitiendo que los LB respondan a bajas concentraciones de antígeno, siendo clave para la selección positiva, activación periférica y mantenimiento de la respuesta humoral. Su deficiencia provoca disminución de anticuerpos y su sobreexpresión se asocia con autoinmunidad, subrayando su papel en el equilibrio de la activación de los LB (162).

7.1.2.0 CD38

El CD38 es una ectoenzima transmembrana con funciones como ADP-ribosil ciclasa y cADPR hidrolasa, regulando la síntesis y degradación de cADPR, un segundo mensajero que moviliza calcio desde reservorios intracelulares vía receptores de rianodina. Se expresa a bajos niveles en LB maduros en reposo, pero aumenta notablemente tras la activación y durante la diferenciación a células plasmáticas, regulado por citoquinas como IL-4 e IL-13 y factores como IRF4 y BLIMP-1. Además de su papel en la señalización de calcio (163), actúa como molécula de adhesión, facilitando interacciones célula-célula y célula-matriz. Su alta expresión en células plasmáticas lo convierte en un marcador útil en contextos fisiológicos y patológicos, incluido el mieloma múltiple (164,165) .

7.1.2.1 CD40

El CD40 es una glicoproteína transmembrana de la superfamilia de receptores TNF, expresada en LB, células dendríticas, macrófagos y epiteliales. Es clave en la activación dependiente de linfocitos T, recibiendo señales coestimuladoras a través de CD40L. Su activación regula procesos como supervivencia, cambio de isotipo, formación de centros germinales y diferenciación a células plasmáticas y de memoria. Señaliza mediante NF- κ B (TRAF2, TRAF3, TRAF5, TRAF6), MAPK (ERK, JNK, p38), PI3K/Akt y JAK/STAT, induciendo genes de supervivencia, proliferación y diferenciación, así como factores anti apoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL), citoquinas (IL-6, IL-10) y factores de transcripción como c-Myc. (138,155,166).

7.1.2.2 CD27

El CD27 es una glicoproteína transmembrana de la superfamilia de receptores TNF y marcador distintivo de linfocitos B de memoria. Su ligando, CD70, se expresa en linfocitos T, LB y células dendríticas activadas. Se encuentra en niveles bajos en LB vírgenes y elevado en LB de memoria, facilitando su diferenciación fenotípica (CD27⁻ vs. CD27⁺). La señalización por CD27 favorece la supervivencia, proliferación y diferenciación hacia células plasmáticas, así como el mantenimiento de la producción de anticuerpos a largo plazo. Además, se asocia al cambio de

isotipo y puede mostrar expresión aberrante en linfomas B, afectando el pronóstico (167,168).

7.1.2.3 CD45

CD45, también conocido como PTPRC (Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type C) o antígeno leucocitario común (LCA), es una glicoproteína transmembrana expresada abundantemente en todas las células hematopoyéticas nucleadas, especialmente en linfocitos, y es un regulador esencial de la activación mediada por receptores de antígenos de los LT y LB. El CD45 desempeña un papel crucial en las etapas iniciales de transmisión de señales y alteraciones en la expresión génica y los desequilibrios en las isoformas de CD45 frecuentemente causan inmunodeficiencias, trastornos autoinmunes y enfermedades oncológicas (169,170).

7.1.2.4 HLA-DR

Las moléculas codificadas por los genes del HLA de clase II son HLA-DR, -DP y -DQ, los cuales tienen expresión restringida en las células presentadoras de antígenos y su función principal de HLA-DR es presentar antígenos peptídicos a los LT CD4+. El HLA-DR también puede servir como un marcador de activación celular (171,172).

7.1.2.5 STING

La vía cGAS–STING es importante en la detección de DNA citosólico que desencadena respuestas inmunes antivirales y antitumorales. El sensor cGAS reconoce el DNA intracelular y produce cGAMP, que activa a STING en el retículo endoplasmático, iniciando una señalización que culmina en la activación de IRF3 y NF-κB, e induce la expresión de interferones tipo I y citoquinas proinflamatorias. Su regulación está estrechamente vinculada a la apoptosis, con efectos tanto de activación como de supresión, y su desbalance participa en cáncer, enfermedades neurodegenerativas y autoinmunidad. Este eje representa un punto crítico de la inmunidad innata y un prometedor blanco terapéutico (173,174).

7.1.2.6 CD11b

El CD11b, también conocido como integrina αM (ITGAM) o Mac-1, es una glicoproteína expresada principalmente en células mieloides, incluyendo neutrófilos, monocitos, macrófagos y células dendríticas que reconoce iC3b, una fracción del complemento que se deposita sobre patógenos (175). CD11b facilita la adhesión celular por unión a ICAM-1 (CD54), la migración transendotelial y la fagocitosis. Puede tener roles tanto proinflamatorios como reguladores y es crucial para la función de los neutrófilos y macrófagos en sitios de inflamación, permitiendo su reclutamiento desde la circulación hacia los tejidos afectados. Promueve la producción de citoquinas como IL-1 β y TNF. Su expresión en LB es inusual, pero se puede presentar en estados activados atípicos, proinflamatorios o reguladores(176,177) . Si bien este receptor del complemento no está asociado directamente por contacto al reconocimiento de GP63, si se han asociado con que GP63 corta a C3 generando el ligando natural del CD11b el iC3b (178,179). Esa unión en el contexto de *Leishmania* facilita la entrada del parásito a los macrófagos para prolongar su supervivencia.

Tabla 6 Resumen de la descripción funcional de las moléculas analizadas en Linfocitos B

Molécula	Mecanismo o Función Inmunológica	Referencia
Syk	Quinasa clave en señalización del BCR; activa adaptadores como BLNK, PLCγ2, y NF-κB. Regula la supervivencia vía mTOR. Implicado en sinapsis inmunológica y diferenciación de LB.	Scharenberg et al., 2007; Kurosaki et al., 2015
PKC	Activada por Syk y PLCγ2; fosforila IκB permitiendo activación de NF-κB. Regula transcripción de genes proinflamatorios.	Kurosaki et al., 2015
TLR4	Reconoce LPS, activa NF-κB, AP-1 e IRF3 vía MyD88/TRIF. Sinergia con el BCR, amplificando activación de LB.	Kawai & Akira, 2010; Ruprecht & Lanzavecchia, 2006
TLR9	Reconoce DNA CpG; activa IRF7, MyD88, producción de IFN-I y citoquinas proinflamatorias. Induce activación y diferenciación de LB sin señal vía BCR.	Kawai & Akira, 2010; Pone et al., 2010
NF-κB	Factor de transcripción activado vía BCR, TLRs y CD40; regula supervivencia, diferenciación y genes proinflamatorios. Actúa en vía canónica y no canónica de activación celular.	Scharenberg et al., 2007; Kurosaki et al., 2015; Gregory
IgM	Primera Ig secretada, inicia la respuesta humoral; activa complemento vía clásica. En LB B1 se secreta de forma natural; requiere proteína J para unir monómero y generar un pentámero.	Castigli, 2005; Cerutti, 2013; Ehrenstein & Notley, 2010
CD19	Correceptor del BCR; amplifica señal; recluta PI3K, Vav. Esencial para activación, memoria, y tolerancia.	Tedder, 2009
CD38	Enzima y marcador de células plasmáticas; regula Ca ²⁺ vía cADPR. Se usa como marcador diagnóstico en mieloma múltiple.	Borriello et al., 1997; Nutt et al., 2015
CD40	Receptor de CD40L; activa NF-κB, MAPK y PI3K/Akt; esencial en la activación T dependiente. Crucial para cambio de isotipo en centros germinales.	Kurosaki et al., 2015; Borriello et al., 1997
CD27	Receptor de CD70; promueve memoria y diferenciación a célula plasmática.	Nutt et al., 2015
CD45	Fosfatasa tirosina; regula señalización de BCR; controla vía JAKs. Mutaciones en este marcador se asocian con inmunodeficiencias.	Bergantini et al., 2020 Reuvecramp et al., 2024
HLA-DR (MHC-II)	Presenta péptidos exógenos a LT CD4+. Inicia respuesta adaptativa. Marcador de activación en APCs.	Dos santos costa y ElDoha
STING	Activado por cGAMP (vía cGAS), induce IFN-I y citoquinas proinflamatorias. Implicado en inmunidad antiviral y antitumoral.	Shou J. 2023 Hopfner KP, 2020
CD11b (Mac-1)	Promueve adhesión, migración y fagocitosis; reconoce iC3b. Relevante en entrada de Leishmania vía unión a iC3b.	Parka et al., 2017 Cássio et al., 2020 Nickerson et al.,

7.1.2.7 Vías de supervivencia y proliferación en LB

La supervivencia y proliferación están reguladas por la integración de señales del BCR, TLR, CD40 y citoquinas como BAFF e IL-6. Estas vías activan factores de transcripción como NF- κ B y STAT3, promoviendo la expresión de genes anti apoptóticos como Bcl-2 y facilitando la entrada en el ciclo celular. La persistencia de estas señales favorece la diferenciación hacia células productoras de anticuerpos o de memoria (180,181).

7.1.2.8 Muerte celular programada: Apoptosis

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada esencial para mantener la homeostasis inmunológica. En linfocitos B puede activarse mediante señales extrínsecas, como la interacción con receptores de muerte, o por vías intrínsecas, asociadas a estrés celular o daño del DNA. Ambas rutas convergen en la activación de caspasas ejecutoras, principalmente la caspasa-3, considerada la proteasa central del proceso, responsable de degradar proteínas estructurales y funcionales de la célula (182). Este mecanismo permite la eliminación selectiva de linfocitos autorreactivos o sobre activados sin generar inflamación, gracias a cambios morfológicos controlados como la condensación nuclear, fragmentación del DNA y formación de cuerpos apoptóticos que son fagocitados por células vecinas. Además, la apoptosis coexiste con otros tipos de muerte celular, como necrosis, autofagia, necroptosis, piroptosis y ferroptosis, cada uno con rasgos morfológicos y bioquímicos distintivos (183,184).

Con base en la relevancia inmunológica de todos estos procesos, vías y marcadores, se diseñó una estrategia experimental que permitiera evaluar de manera directa el impacto de GP63 sobre los LB. Para ello, se implementaron dos aproximaciones complementarias; la producción de la proteína recombinante GP63 para realizar la exposición exógena y la expresión intracelular mediante un sistema lentiviral. Estas herramientas permitieron ejecutar diferentes interacciones entre la proteasa y los LB, para analizar sus efectos fenotípicos y funcionales.

7.2 MATERIALES Y MÉTODOS

7.2.1 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (MNSP)

Las células mononucleares de sangre periférica (MNSP) fueron aisladas de la muestra de 20ml de sangre venosa, extraída de los donantes sanos. La separación de los mononucleares se dio mediante centrifugación usando un gradiente de Ficoll-Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich) durante 30 min a 450g. Los mononucleares fueron sembrados en placas de 6, 12, 24 pozos con medio RPMI completo, se incubaron en medio RPMI con 10% de SFB a 37°C con 5% CO₂. La disposición de estas células estuvo determinada por el tipo de experimento, de exposición exógena a la proteína GP63 o de transducción con el lentivirus para expresar la proteína intracelularmente.

7.2.2 Exposición de LB Ramos y MNSP a la proteína GP63 recombinante

Para evaluar el potencial efecto de la proteína GP63 sobre LB *in vitro*, se realizó un ensayo de dosis respuesta en LB Ramos. En placa de 48 pozos se cultivaron en medio RPMI completo los LB a una densidad de 2×10^5 células por pozo. Las células se dividieron en dos grupos: una fracción fueron teñidas con CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) para evaluación de la proliferación y otra fracción sin teñir. Una vez estabilizadas, las células fueron tratadas con la proteína GP63 WT/mt a diferentes concentraciones (5, 10, 20 ng/mL), previamente diluidas en medio de cultivo estéril. La proteína fue añadida directamente al medio y las células se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ por 24h y 48 horas para el grupo con CFSE y 48h para los otros análisis. Se incluyeron células sin tratamiento como control sin estímulo. Finalizada la incubación, las células fueron recolectadas para análisis por citometría de flujo de la viabilidad, proliferación y activación; adicionalmente se colectaron los sobrenadantes para cuantificación de citoquinas y anticuerpos.

7.2.3 Análisis de viabilidad

La viabilidad celular se evaluó por dos métodos complementarios: citometría de flujo utilizando 7-aminoactinomicina D (7-AAD Viability Staining Solution, BioLegend #420404) y conteo manual en cámara de Neubauer con azul de tripán. Para el análisis por citometría, las células recolectadas de los experimentos se centrifugaron y se lavaron con PBS 1x; posteriormente se adicionó el equivalente a una concentración final de 5 µg/mL durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Luego, las muestras fueron lavadas y suspendidas en 400 µL de PBS 1x y analizadas por citometría de flujo en BD FACSCanto; se seleccionaron las células 7-AAD⁺ (permeables) como no viables, expresadas en porcentaje de viabilidad dentro de una población total.

En paralelo, se realizó un conteo manual, mezclando volúmenes iguales de suspensión celular y azul de tripán al 0.4% (Sigma-Aldrich), y se cargaron 10 µL en una cámara de Neubauer. Las células viables (no incorporan el colorante y se ven claras) y las no viables (azuladas) se contaron bajo un microscopio óptico de luz con aumento de 10x o 20x. Estas aproximaciones se utilizaron tanto para las células tratadas exógenamente o transducidas.

7.2.3.1 Determinación de tipo de muerte celular

La caracterización del tipo de muerte celular se realizó utilizando el marcador 7AAD junto al marcador de apoptosis Apotracker™ Green (BioLegend #750000921) que permite discriminar células con membrana plasmática comprometida. Un millón de células fueron recolectadas, lavadas con PBS 1x y marcadas con 5 µL de cada solución. La incubación se realizó durante 15 minutos a temperatura ambiente, protegida de la luz. Posteriormente, las muestras fueron lavadas y suspendidas en 400 µL de PBS 1x y analizadas inmediatamente en el citómetro de flujo. Los datos fueron analizados mediante software de citometría (FlowJo v10.10) ajustando los cuadrantes con controles sin tinción, células viables y células tratadas y obteniendo

el porcentaje o frecuencia de células viables, células en apoptosis temprana, células en apoptosis tardía y necrosis.

7.2.3.2 Evaluación morfología de los cultivos por microscopía de luz y fluorescencia

Los cultivos celulares fueron monitoreados diariamente mediante microscopía invertida luz y de fluorescencia, para evaluar el estado general de las células y la expresión de la GFP tras la transducción. Las observaciones se realizaron utilizando un microscopio invertido (Thermo Scientific EVOS FL Cell Imaging System) equipado con filtros adecuados para la detección de fluorescencia verde (excitación ~488 nm, emisión ~510–530 nm). Se documentaron imágenes representativas de los cultivos en distintos aumentos (4x, 10x, 20x y 40x), permitiendo registrar tanto la morfología celular como la intensidad y distribución de la GFP en las células transducidas. Además, se prestó especial atención a la morfología celular, con el fin de identificar características compatibles con procesos de muerte celular, tales como apoptosis (retracción celular, formación de cuerpos apoptóticos, condensación nuclear), así como posibles alteraciones relacionadas con otros tipos de muerte no convencional. El análisis de fluorescencia permitió estimar de manera cualitativa la eficiencia de transducción y descartar auto fluorescencia o contaminación. Las imágenes se almacenaron en formato digital con fecha y condición correspondiente para su posterior análisis.

7.2.4 Determinación de proliferación

La proliferación celular se evaluó mediante tinción (CFSE, BioLegend), este colorante fluorescente se une covalentemente a las proteínas citoplasmáticas y se diluye progresivamente con cada división celular. Para los LB se determinó un número máximo de 4 generaciones para las evaluaciones a las 48h de cultivo, por el ritmo biológico de proliferación de esta línea celular (nueva generación cada 12 - 24h). El número de LB teñido dependió de cada experimento; las células se lavaron

con PBS 1x y luego se suspendieron en 500ul de PBS1x y 500ul de la solución de CFSE (preparada previamente a 5mM en DMSO). Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Para detener la tinción y permitir la unión estable del colorante, se añadió 1mL de SF) frío y se incubó por 1 min a 4°C. Luego, se adicionaron 10mL de PBS 1x y se centrifugaron por 5min.

Posteriormente, las células fueron suspendidas en medio RPMI completo y sembradas en las condiciones experimentales de tratamiento con la proteína recombinante GP63. Los datos se adquirieron por citometría de flujo en el canal de fluoresceína (FITC), desde el momento cero de incubación, las 24 y 48 horas post estímulos. El análisis se realizó utilizando software como FlowJo v10.10 aplicando un modelo matemático de predicción para calcular el índice de proliferación, el índice de divisiones y el índice de expansión celular.

En los LB transducidos con el lentivirus LV-MND-GP63 se realizó un seguimiento de conteo celular por 21 días, para comprobar el número de células totales en el cultivo posterior a la transducción con diferentes MOI del virus. Este conteo se realizó con azul de tripán en cámara de Neubauer, y así se pudo obtener el valor (Fold Increase) de la proliferación celular.

7.2.5 Cuantificación de marcadores celulares y citoquinas intracelulares por citometría de flujo

La caracterización fenotípica de LB fue realizada mediante citometría de flujo enfocándose en marcadores tanto de membrana como intracelulares asociados a la activación (CD38, HLA-DR, CD40, Syk, STING), diferenciación (CD38, CD11b, CD27) y linaje (CD19, CD45), (Tabla 7). Las células fueron recolectadas al final de cada tratamiento experimental, procurando alcanzar para estos ensayos una concentración de 1×10^6 células. Las células obtenidas, fueron lavadas con PBS 1x y suspendidas en el volumen final de la solución que contenía los anticuerpos monoclonales conjugados directamente a fluorocromos durante 15-20 minutos en

oscuridad. Posteriormente, se lavaron dos veces con PBS 1x y se continuó directamente el análisis en el citómetro para aquellos marcadores que no necesitaran fijación.

Para aquellos marcadores de características intracelulares o que requerían fijación, posterior a los lavados, se les adicionó una solución de fijación con paraformaldehído al 4% y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se lavaron con PBS 1x, y se permeabilizaron usando un buffer de permeabilización y el volumen del anticuerpo intracelular en la misma solución incubando por 20 min. Finalmente, se lavaron con PBS 1x y las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo. Se aplicaron controles de compensación para el análisis de múltiples marcadores. El análisis de datos se realizó con FlowJo v10.10 aplicando estrategias de “gating” secuencial para excluir detritos celulares y dobles, para luego identificar y evaluar las diferentes subpoblaciones de interés, con base en la intensidad de fluorescencia de los distintos marcadores.

Tabla 7 Anticuerpos para la detección de marcadores celulares por citometría de flujo

Anticuerpo	Fluorocromo	Clon	Marca	Catálogo / Ref.	Tipo de marcador
CASPASA 3 activa	PE	C92-605	BD Pharmigen™	550821	Intracelular (apoptosis)
CD11b	APC-Cy7	M1/70	Invitrogen	A15390	Superficie
CD19	APC	HIB19	BD Pharmigen™	555415	Superficie
CD19	PE	HIB19	BD Pharmigen™	555413	Superficie
CD27	PE-Cy7	O323	BD Pharmigen™	567289	Superficie
CD3	PE-Cy7	UCHT1	BioLegend®	300420	Superficie
CD38	FITC	HIT2	BD Pharmigen™	555459	Superficie
CD40	PE	FGK45	BioLegend®	157506	Superficie
CD4	APC-Cy7	RPA-T4	BioLegend®	300518	Superficie
CD45	APC	H130	BioLegend®	304037	Superficie
GP63	N/A	96/26	Bio-Rad	OBT2004	Intracelular (primario)
HLA-DR	PE	TU36	Invitrogen	MHLDR04	Superficie
HLA-DR	PE-Cy7	LN3	BioLegend®	327018	Superficie
His tag	PE	J095G46	BioLegend®	362603	Superficie (tag)
His tag	APC	J095G46	BioLegend®	362605	Superficie (tag)
His tag	PE-Cy7	J095G46	BioLegend®	362620	Superficie (tag)
IgM total	FITC	G20-127	BD Pharmigen™	555782	Superficie
IL-10	PE	JES5-16E3	BioLegend®	505001	Intracelular (citoquina)
STING	PE	T3-680	BD Pharmigen™	564965	Intracelular
Syk	APC	4D10.2	BioLegend®	644306	Intracelular (señalización)
Syk	APC	4D10.2	BioLegend®	644305	Intracelular
Syk	FITC	4D10	BD Pharmigen™	552476	Intracelular
TNF	PE	Mab11	BD Pharmigen™	559321	Intracelular (citoquina)
TNF	FITC	Mab11	BioLegend®	502906	Intracelular
Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody	PE	No dato	Invitrogen	P852	Superficie / intracelular
Goat Anti-Mouse Ig (Multiple Adsorption)	APC	Poly1270	BD Pharmigen™	550826	Superficie / intracelular

7.2.6 Ensayos de cuantificación molecular

7.2.6.1 Concentración de TNF, IL-6 e IgM en el sobrenadante.

La detección cuantitativa de la citoquinas TNF, IL-6 y el anticuerpo IgM, se realizó mediante un ensayo de ELISA competitivo utilizando los kits comerciales (Tabla 8.0). Las muestras, controles y curva de calibración fueron incubados en placas previamente recubiertas con anticuerpos específicos. Tras ser lavados para eliminar material no unido, se añadió el anticuerpo secundario conjugado a HRP, la señal se desarrolló mediante la adición del sustrato TMB, y la reacción se detuvo con solución ácida. La absorbancia (OD) se midió a 450 nm en un lector de microplacas. La cuantificación se realizó comparando con una curva estándar incluida en el kit, y los resultados se expresaron como concentración de TNF (pg/mL), IL-6 (pg/mL) e IgM (ng/mL).

7.2.6.2 Concentración de GP63 intracelular

La proteína GP63 expresada intracelularmente fue cuantificada mediante citometría de flujo en diferentes tiempos post transfección (3, 4, 5, 7, 10, 14 y 21 días). Dado que se trató de una detección intracelular, las células fueron previamente fijadas y permeabilizadas para permitir el acceso del anticuerpo durante la tinción. Las muestras se incubaron con el anticuerpo anti-GP63 (*Leishmania Major* Surface Protease gp63 antibody 96/26 isotipo IgG2a de Biorad) y con un anticuerpo secundario (Invitrogen™ Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, PE). Posterior a la incubación, los datos fueron adquiridos en el citómetro de flujo BD Canto y se analizan los resultados en el software Flowjo v10.10.

Tabla 8 Ensayos inmunoenzimático ELISA para cuantificación

Molécula	Kit (Invitrogen)	Número de Catálogo	Límite de detección	Rango dinámico	Tipo de muestra
<i>TNF</i>	Human TNF- α ELISA Kit	BMS213INST	~3 pg/mL	15.6–1000 pg/mL	Suero, plasma, sobrenadante
<i>IL-6</i>	Human IL-6 ELISA Kit	BMS223INST	~1 pg/mL	7.8–500 pg/mL	Suero, plasma, sobrenadante
<i>IgM</i>	Human IgM ELISA Kit	88-50620	~4 ng/mL	125–8000 ng/mL	Suero, plasma, sobrenadante

7.2.7 Activación de LB Ramos *in vitro*

Para la activación de LB en cultivo, las células fueron sembradas a una densidad de $0.5\text{--}1 \times 10^6$ células/mL en medio RPMI completo. Se estimularon con lipopolisacárido (LPS, 10-50 $\mu\text{g/mL}$), PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate, 50 ng/mL) y/u oligonucleótidos CpG tipo B (1–10 $\mu\text{g/mL}$), agregados directamente al medio de cultivo. Las células se incubaron a 37 °C con 5% CO_2 por 24 horas. Se incluyeron controles sin estímulo, para evaluar de forma comparativa la activación celular mediante citometría de flujo. En los ensayos donde se evaluó la producción intracelular de citoquinas post activación, como IL-10, y TNF se añadió Brefeldina A (Biosciences) al cultivo celular a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ durante las últimas 4 horas de incubación. Este tratamiento es un inhibidor del transporte vesicular del retículo endoplasmático al aparato de Golgi, y se usa comúnmente para atrapar citoquinas intracelulares, ya que inhibe la secreción de citoquinas, permitiendo su acumulación intracelular y posterior detección por citometría de flujo.

7.2.8 Transducción de LB Ramos y MNSP con LV-MND-GP63 y LV-MND-GFP

Los LB Ramos y MNSP de donantes sanos fueron transducidos con el vector lentiviral (LV-MND-GP63 WT o mt) que codifica la proteasa GP63. En los casos en que se requería un control de transducción para validar la expresión de una proteína distinta, se utilizó un lentivirus codificante para el gen reportero GFP (LV-EF1 α -GFP), con el objetivo de determinar si los efectos observados estaban vinculados al sistema de expresión o a la proteína expresada. Este lentivirus fue suministrado por el Dr. Uimook Choi, staff del LCIM-GIS del NIH.

Previamente, las partículas virales fueron producidas en células GPRTC (HEK293-GPR) y concentradas por ultra centrifugación y tituladas. Con la concentración viral del stock de lentivirus y con la densidad de células calculadas para el experimento, se calcularon con anticipación los MOI. Las células fueron cultivadas en medio RPMI completo, a la densidad requerida para alcanzar el MOI del experimento. Para incrementar la eficiencia de transducción, se emplearon potenciadores de la transducción como el LentiBOOST™ (Sirion Biotech), un potenciador de transducción, añadido directamente al medio de cultivo a una concentración de 1 μ g/mL o el Polybrene (hexadimetrina bromuro, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 8 μ g/mL. Inmediatamente después, se agregó el lentivirus a la dosis correspondiente (MOI previamente determinado). Las células fueron incubadas a 37 °C con 5% de CO₂. La eficiencia de transducción fue evaluada entre 48 y 72 horas post transducción mediante citometría de flujo, evaluando la expresión intracelular de la proteína GP63 o del control GFP o mediante tinción intracelular. Se incluyeron controles sin vector para discriminar efectos inespecíficos (Anexo 7).

7.2.9 Extracción de DNA y PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) para cuantificación del número de copias del vector por célula o (Vector copy number VCN)

De cada experimento de transducción en LB Ramos y MNSP se recolectaron 1x10⁶ células para cuantificación del VCN. Estas células fueron conservadas a -80°C hasta su procesamiento. La extracción del DNA se realizó con el kit comercial

"DNeasy Blood & Tissue" (Qiagen). Las células se lisaron mediante incubación con tampón ATL y proteinasa K a 56 °C hasta completar la digestión. Posteriormente, se añadió tampón AL y etanol al 100% para favorecer la unión del DNA a la membrana de sílica de las columnas. Luego se sometieron a una serie de lavados con los buffers AW1 y AW2 para eliminar proteínas, sales y otros contaminantes. Finalmente, el DNA fue eluido en un volumen apropiado de buffer AE. La concentración y pureza del DNA extraído se evaluó por espectrofotómetro (Thermo Scientific™ NanoDrop™ One C Microvolume UV-Vis) considerando una relación A260/280 entre 1.8 y 2.0 como indicador de pureza adecuada. Se evaluó la expresión del fragmento HIV-U5-PBS, que es una región específica del genoma del VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana) que se encuentra en el extremo 5' de la LTR (Long Terminal Repeat) del virus. Para realizar la cuantificación comparativa se utilizó como gen normalizador humano *mk12* (*myocardin-like protein 2*). El cual codifica una proteína reguladora de genes involucrados en el citoesqueleto de actina y diferenciación muscular. El número de células se calculó como la mitad del conteo de *MLK2*, ya que cada célula es diploide. Se utilizaron los siguientes esquemas de cebadores y sondas:

HIV-PBS Assay

<i>HIV-U5-PBS_F</i>	5' CTGTTGTGTGACTCTGGTAACT 3'
<i>HIV-U5-PBS_R</i>	5' TCGCTTTCAAGTCCCTGTTC 3'
<i>HIV-U5-PBS_Probe</i>	5'- /56-FAM/AA ATC TCT A/ZEN/G CAG TGG CGC CCG /3IABkFQ/ -3'

MLK2 Assay

<i>MLK2-lastExon_F</i>	5' AGATCAGAAGGGTGAGAAGAATG 3'
<i>MLK2-lastExon_R</i>	5' GGATGGTCTGGTAGTTGTAGTG 3'
<i>MLK2-lastExon_Probe</i>	5'- /5-HEX/TG TTC CTG C/ZEN/A ACT GCA GAT CCT GA/3IABkFQ/ -3'

Se definieron los niveles de expresión relativa por el método de $\Delta\Delta C_t$. La amplificación y medición en tiempo real se realizó en un 7500 Fast Real-Time PCR System de Applied Biosystems.

7.3 RESULTADOS CAPÍTULO 3

7.3.1 Efecto de la proteína recombinante GP63 WT/mt sobre LB Ramos y MNSP humanos

En este proyecto evaluamos el potencial efecto de la proteína GP63 sobre células inmunes humanas. Como primer paso, expusimos linfocitos B humanos a la proteasa con el objetivo de determinar si induce cambios en la viabilidad, la proliferación y la expresión de marcadores relacionados con la señalización y activación celular.

7.3.1.1 La viabilidad y proliferación de los LB Ramos expuestos a GP63 WT recombinante disminuye de forma dosis dependiente.

Utilizando la proteína GP63 recombinante producida en células HEK293T, se realizaron ensayos de dosis-respuesta en células Ramos expuestas durante 48 horas a concentraciones de 5, 10 y 20 ng/mL de GP63 en su forma WT o mt. Se observó una disminución significativa en la viabilidad celular con la dosis más alta de GP63 WT, alcanzando un 61.8% de células viables tras 48 horas de exposición. En contraste, las condiciones con 5 y 10 ng/mL de GP63, así como el control sin estímulo, mantuvieron una viabilidad superior al 90% (Figura 17 A). A diferencia de, la exposición a la misma concentración de la proteína mutante (GP63 mt) mantuvo la viabilidad celular por encima del 70% (Figura 17 B). Estos resultados sugieren que la actividad catalítica de la proteína GP63 WT podría comprometer la integridad celular, provocando una disminución en la supervivencia de los linfocitos B. La citotoxicidad fue evaluada mediante la exclusión de azul de tripán y la detección de células positivas para el marcador 7-AAD por citometría de flujo. Igualmente, los linfocitos B Ramos expuestos a la proteína GP63 recombinante mostraron una disminución en su capacidad proliferativa, determinada con CFSE por citometría de flujo. El modelo de proliferación celular de LB Ramos sin estímulos, se muestra en la Figura 18 A. En los ensayos con la proteína GP63 recombinante, se determinó

un número máximo de 4 generaciones a las 48h de cultivo, teniendo en cuenta el ritmo biológico de proliferación de esta línea celular (nueva generación cada 12 - 24h). El modelo sugiere que en la concentración de 20ng/mL, hay una disminución significativa del índice de proliferación y de expansión de los LB tratados con la proteína WT, comparado con el control sin estímulo (Figura 18 B). El índice de división presenta la misma tendencia, sin un valor de p significativo (Figura 18 C); finalmente, el análisis con la proteína mutante muestra que no tiene mayor impacto sobre la proliferación de los LB a ninguna de las concentraciones probadas.

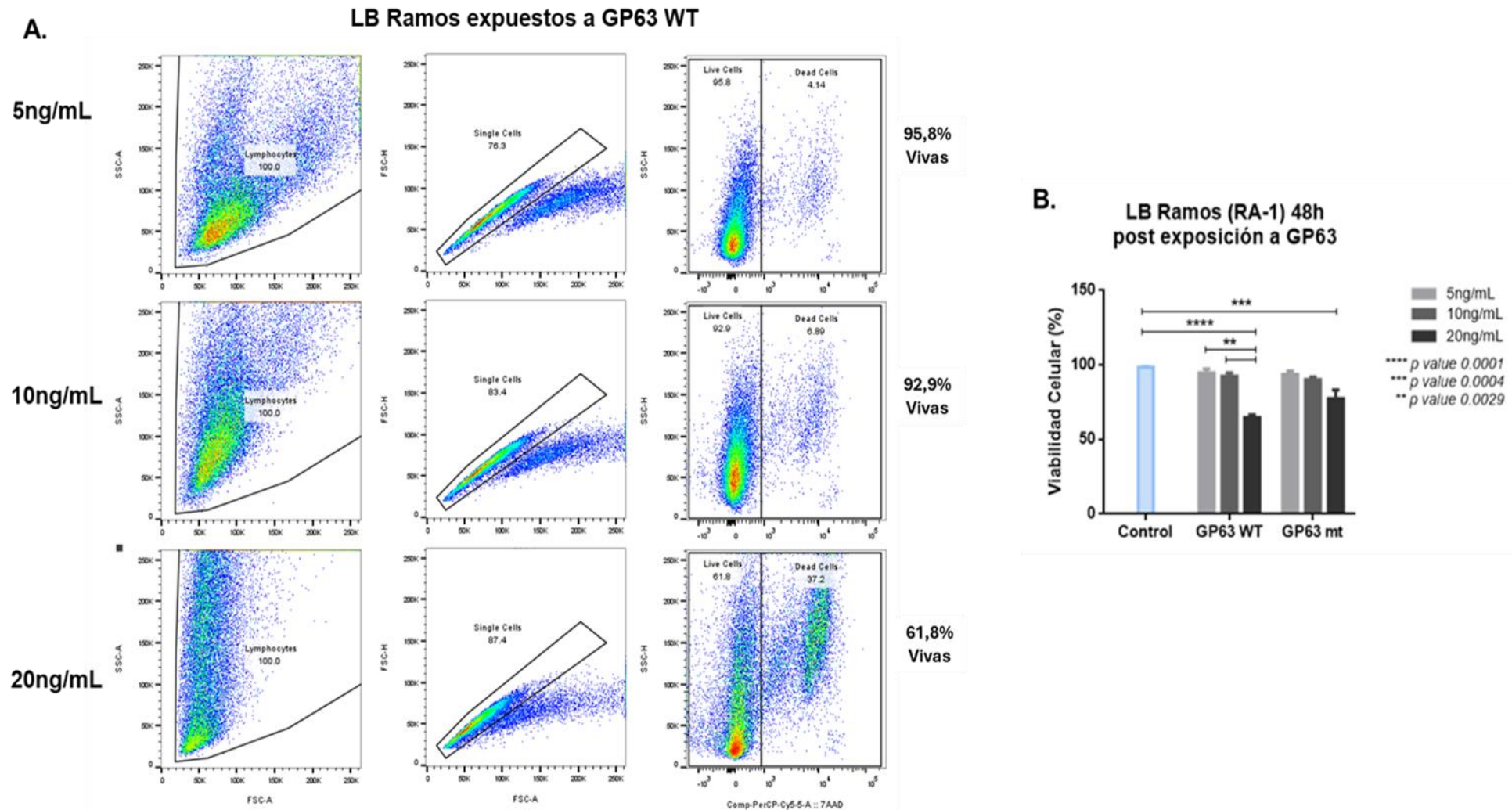


Figura 17 La viabilidad de los LB disminuye de forma dosis dependiente con la exposición a GP63 WT recombinante.

LB Ramos expuestos por 48h *in vitro* a dosis creciente de la proteína GP63 WT o mt. **A)** Evaluación de la viabilidad celular por citometría de flujo con el marcador 7AAD, plots de análisis con la proteína WT. **B)** Porcentaje de viabilidad celular. Datos confirmados en conteo con azul de tripán en cámara y contador celular automático, los datos representan (n=3) réplicas biológicas. La prueba estadística realizada es ANOVA de dos vías y sus comparaciones múltiples (test de Tukey). Los asteriscos indican un valor de significancia *p <0.05.

7.3.1.2 Los linfocitos B Ramos tratados con GP63 WT expresan mayores niveles de CD38.

Dado que la viabilidad y la proliferación pueden estar influenciadas por señales de activación celular, se evaluó la expresión de marcadores de superficie (CD19, CD38 y HLA-DR) e intracelular (Syk) de los linfocitos B Ramos, para determinar si GP63 induce cambios fenotípicos asociados a su activación funcional.

En los mismos ensayos de exposición por 48h a diferentes dosis de la proteína GP63 WT o mt, se determinó por citometría de flujo el valor de intensidad media de fluorescencia (MFI) diferencial entre estos marcadores (Figura 19 A-B). Se encontró que CD19 siendo un marcador de linaje de linfocitos B, con participación en la amplificación de señales vía BCR, no tuvo mayores diferencias en su expresión respecto al control, ni con la proteína mutante, indicando que no hubo pérdida del linaje B en estas células (Figura 19 A). En el mismo sentido, la expresión intracelular de Syk, tirosina quinasa clave en la señalización vía BCR (corriente abajo) no presentó cambios significativos; lo que sugiere que tal vez la activación celular a través de esta vía no fue completamente inducida o inhibida por GP63 (Figura 19 A panel superior).

La expresión de HLA-DR una molécula del MHC-II implicada en presentación antigénica, no mostró diferencias significativas entre las condiciones evaluadas, pero sí una leve tendencia a aumentar su expresión de forma dosis dependiente con la proteína WT, esto sugiere que la capacidad para presentar antígenos en general no estaría alterada (Figura 19 A panel inferior).

En contraste, la expresión de CD38, molécula asociada con activación celular, diferenciación y regulación de funciones inmunológicas, mostró un aumento significativo en la intensidad media de fluorescencia (MFI) tras la exposición a 20 ng/mL de GP63 WT, duplicando los niveles observados en el control (Figura 19 B). En cambio, las concentraciones más bajas, así como las exposiciones a la proteína mutante, no evidenciaron cambios relevantes en la expresión de este marcador.

Estos resultados sugieren que la dosis de 20 ng/mL de GP63 WT podría inducir una activación parcial o alternativa en los linfocitos B Ramos. Será necesario contrastar estos hallazgos con la coexpresión de otras moléculas, incluyendo receptores y citoquinas, para determinar su relevancia biológica y funcional.

7.3.1.3 La sobreexpresión de la molécula CD38 por estímulo de GP63 WT se conserva en un modelo inmunológico más complejo como los MNSP

De manera consistente a lo observado en la línea celular de LB Ramos, el aumento de CD38 se mantuvo en los linfocitos B derivados de células mononucleares de sangre periférica (Figura 20 A). La expresión de CD38 aumentó progresivamente con el tiempo, con una expresión máxima a las 72h siendo 3 veces más alta que el control sin estímulo (Figura 20 B). Esto sugiere que el efecto podría ser reproducible en un modelo fisiológicamente más relevante y no un hallazgo particular de la línea celular.

Si bien el resultado obtenido en MNSP proviene de una sola réplica biológica, la tendencia observada es clara y coherente con el efecto detectado previamente en el otro modelo. Estos hallazgos merecen ser considerados y explorados en futuros estudios con mayor poder estadístico.

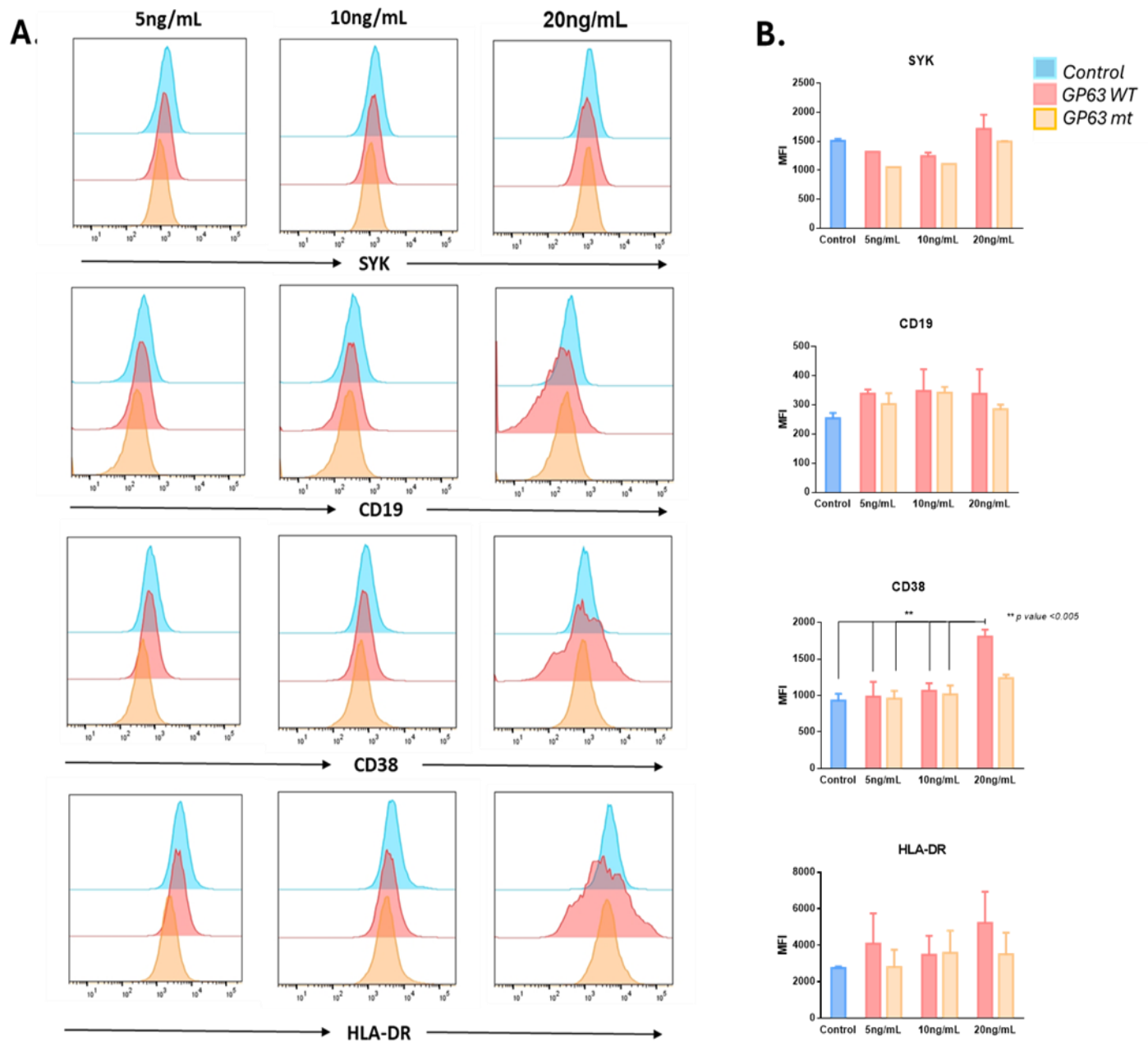


Figura 19 Marcadores celulares de LB Ramos modulados tras la exposición a diferentes concentraciones de GP63 WT o mt.

Distribución y cuantificación de las proteínas Syk, CD19, CD38 y HLA-DR, en linfocitos B de la línea celular Ramos posterior a la exposición *in vitro* a 5, 10 y 20ng/ml de GP63 recombinante durante 48 h. **A)** Histograma de los marcadores representados como: sin estímulo (control) en azul, estímulo con proteína WT en rojo y estímulo con proteína mutante (E265A) en naranja. **B)** Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) para cada grupo. Los datos de cada grupo están representados por la mediana (n=3) réplicas biológicas. La prueba estadística realizada es ANOVA de dos vías y sus comparaciones múltiples (test de Tukey). Los asteriscos indican un valor de significancia **p < 0.005.

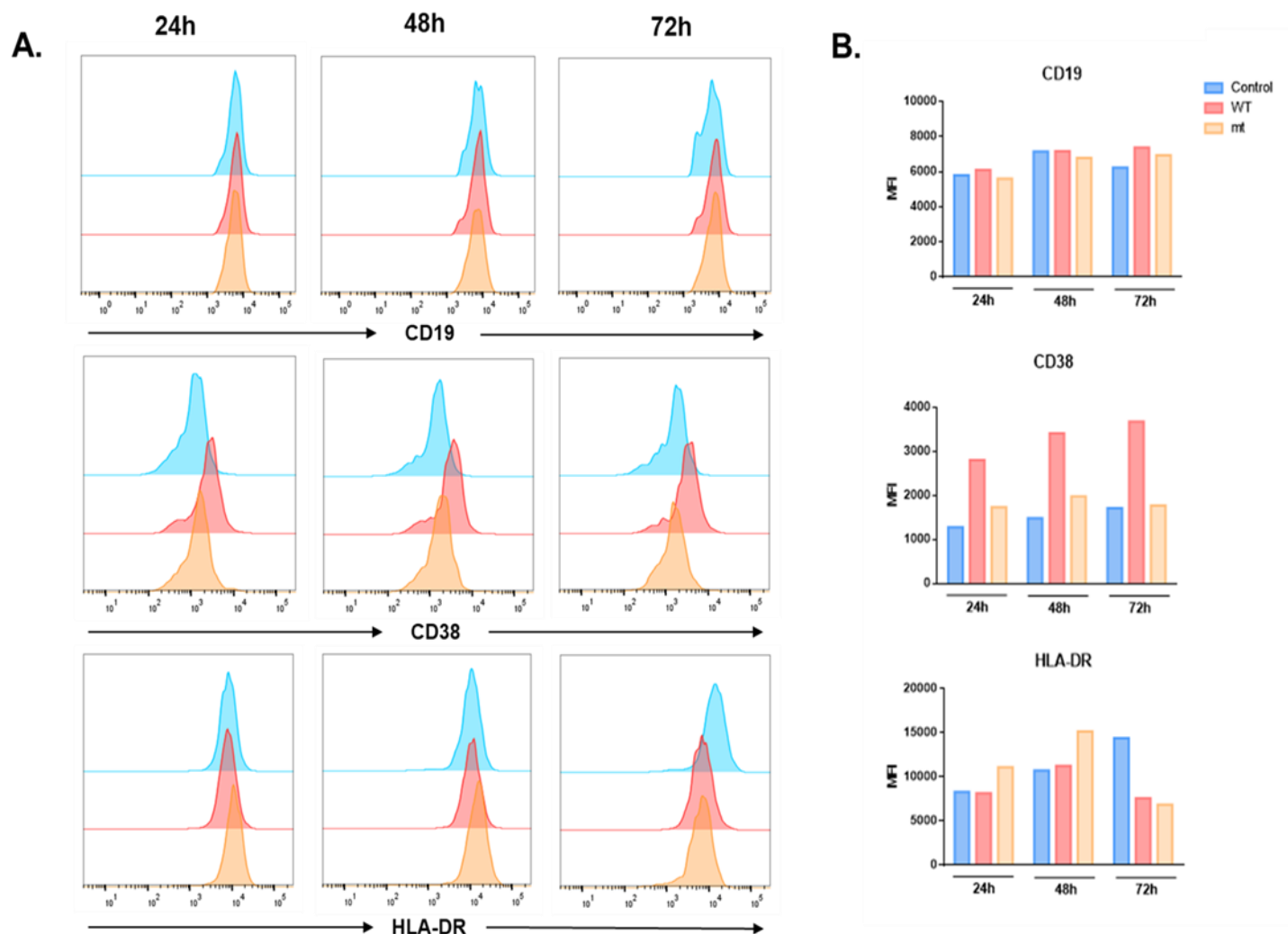


Figura 20 Cinética de expresión de marcadores celulares en MNSP (HD) tratados con una dosis única de 20ng/mL de GP63.

Distribución y cuantificación de las proteínas CD19, CD38 y HLA-DR en mononucleares de sangre periférica (MNSP) de un donante sano, con exposición *in vitro* a 20ng/ml de GP63 WT o mt, durante 24, 48 y 72h. **A)** Histograma de las poblaciones: sin estímulo (control) en azul, estímulo con proteína WT en rojo y estímulo con proteína mutante (E265A) en naranja. **B)** Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) para cada marcador. Los datos corresponden a un n=1.

7.3.1.4 La exposición a GP63 recombinante induce la producción de la citoquina TNF y la inhibición de IgM e IL-6.

En los ensayos de detección de TNF humana, se observó una inducción de esta citoquina proinflamatoria tras la exposición a 20 ng/mL de las formas WT y mutante de la proteína GP63. Este efecto fue evidente tanto en la línea celular de linfocitos B Ramos (tras 48 horas de tratamiento) como en células mononucleares de sangre periférica (MNSP) de un donante sano, estimuladas durante 48 y 72 horas. En los linfocitos B Ramos, la secreción de TNF alcanzó en promedio 10 pg/mL en ambas condiciones (WT y mutante), duplicando los niveles del control sin estímulo, sin diferencias significativas entre ambas formas de la proteína (Figura 21 A). En contraste, en el modelo de MNSP, las concentraciones de TNF fueron aproximadamente el doble con la proteína WT y hasta seis veces mayores con la proteína mutante, en comparación con el control (Figura 21 B).

Con relación a la IgM soluble, detectada en el sobrenadante de los cultivos de LB Ramos y en MNSP, se encontró que bajo efecto de la proteasa WT los niveles de IgM fueron bajos con respecto al control a través del tiempo. Esto fue más evidente en la línea celular donde la concentración de IgM en la condición WT fue en promedio 318ng/mL comparado con un 814ng/mL del control, mientras que con la intervención mutante fue 626ng/mL de IgM. En los MNSP observamos la mitad de lo obtenido en la línea celular, pero conservando la tendencia de que en la presencia de la proteasa tanto WT como mt se mantuvieron muy por debajo del control a las 48 y 72h de medición (Figura C-D). Esto sugiere que las células pueden estar en un estado de activación y diferenciación menos avanzado, por influencia de la proteasa o una inmunomodulación que pueda estar regulando la respuesta humoral.

Finalmente, se hizo medición de IL-6 en el sobrenadante de estos experimentos y en ninguna de las condiciones analizadas hubo detección de esta citoquina. Tras repeticiones confirmatorias, se concluye que la proteasa GP63 WT o mutante no afectan la producción de IL-6 en los LB Ramos.

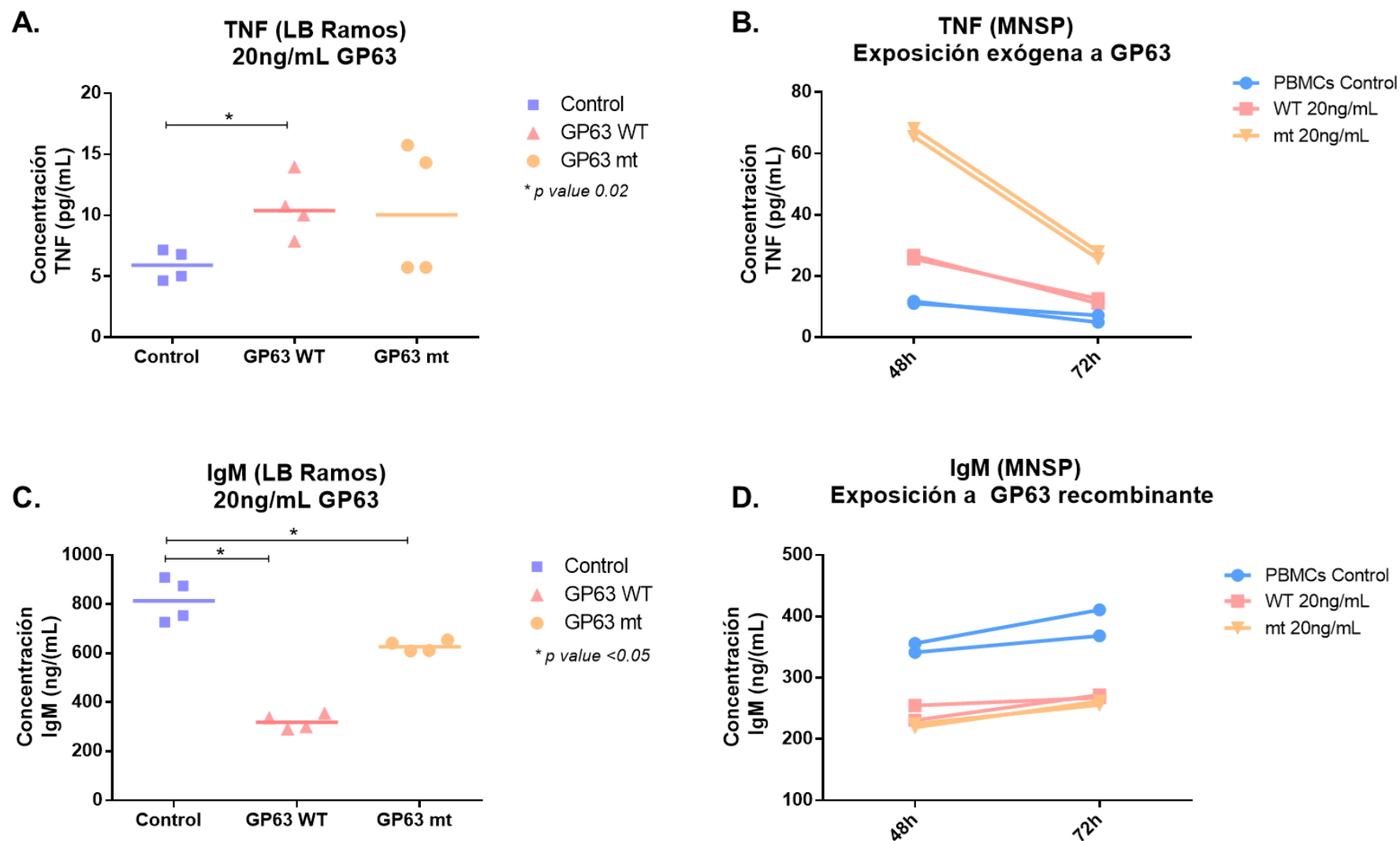


Figura 21 Concentración de TNF e IgM en LB Ramos y MNSP expuestos a GP63 recombinante. Ensayo inmuno enzimático (ELISA) para la cuantificación de TNF (A y B) y de IgM soluble (C y D). **A)** TNF de LB Ramos con exposición *in vitro* a 20ng/ml de GP63 WT o mt, durante 48h (n=4). **B)** TNF de MNSP tratados *in vitro* con 20ng/ml de GP63 WT o mt, por 48 y 72h. Los datos corresponden a un donante sano con n=2 réplicas experimentales. **C)** Niveles de IgM en LB Ramos. **D)** Niveles de IgM en MNSP. La prueba estadística aplicada es test Mann Whitney con un valor de significancia * p <0.05.

7.3.1.5 Evaluación de la expresión de marcadores celulares y cuantificación de las citoquinas TNF e IL-10.

Se estimularon LB Ramos por 24h con activadores como LPS, PMA, CpG y con la proteína GP63 recombinante en su forma nativa (WT) y mutante (mt). Estos compuestos se seleccionaron por su capacidad de inducir activación a través de distintas vías, LPS y CpG mediante los TLRs (TLR4 y TLR9, respectivamente) y PMA para activación directa de la proteína quinasa C (PKC). El objetivo fue comparar el efecto de GP63 y de los activadores conocidos sobre los LB Ramos. Inicialmente, se analizó por citometría de flujo los niveles de CD19, CD38 e incorporamos unos marcadores adicionales para identificar el estado de memoria, madurez y regulación celular como CD27, CD45 y CD11b respectivamente.

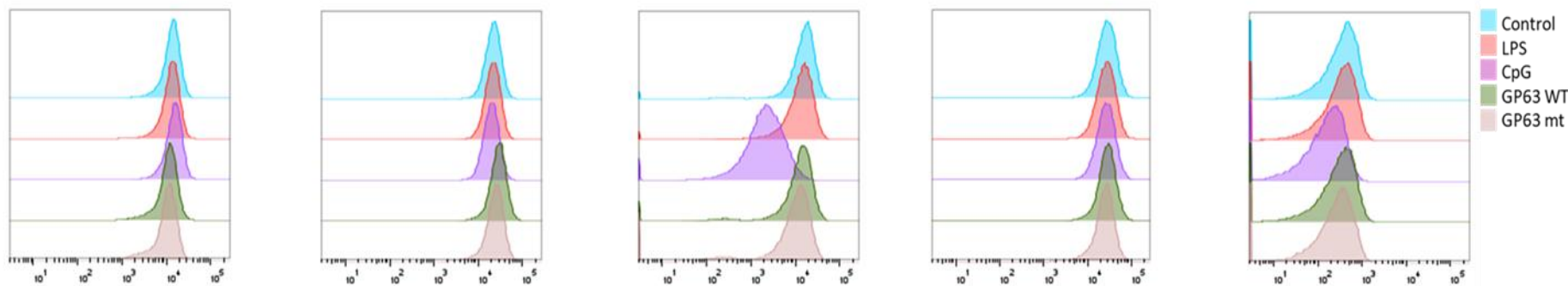
En general, no hay inducciones significativas en la expresión de estas moléculas por efecto de los activadores conocidos. Sin embargo, se conservó la tendencia de inducción de CD38 con la proteasa WT (Figura 22 A,B), este fenómeno se manifiesta exclusivamente en presencia de esta versión de la proteína, y no se observa con otros activadores, demostrando que este evento podría ser mediado por la actividad de la proteasa. En el tratamiento con CpG se ve una menor MFI para CD27 y CD11b (Figura 22 B), lo que puede corresponder a un menor número de células, por pérdida de la muestra durante su procesamiento.

Por otro lado, teniendo en cuenta la naturaleza del experimento (activación celular), se detectaron niveles relativamente bajos de TNF en el sobrenadante del cultivo de los LB Ramos. Se evidencia una leve tendencia a la inducción de esta citoquina por LPS y por GP63 mutante, mientras que con la proteína WT los niveles de TNF fueron muy bajos, incluso por debajo del valor del control, indicando que tal vez la proteasa en su forma activa podría mediar los niveles de TNF a nivel extracelular (Figura 23). En paralelo, en experimentos de activación celular por 4 horas, más la acción de la Brefeldina A para la detección de TNF e IL-10 intracelular, se observó que el PMA aumentó considerablemente la expresión de ambas citoquinas al interior de los LB

Ramos, lo que induce un efecto proinflamatorio importante en las células. Mientras que el estímulo con GP63 WT, si bien fue levemente superior al control, su efecto no fue comparable al inducido por PMA. La condición mutante se mantuvo por debajo de los niveles incluso del control y los otros activadores no mostraron cambios (Figura 24).

Linfocitos B Ramos activados por 24h

A.



B.

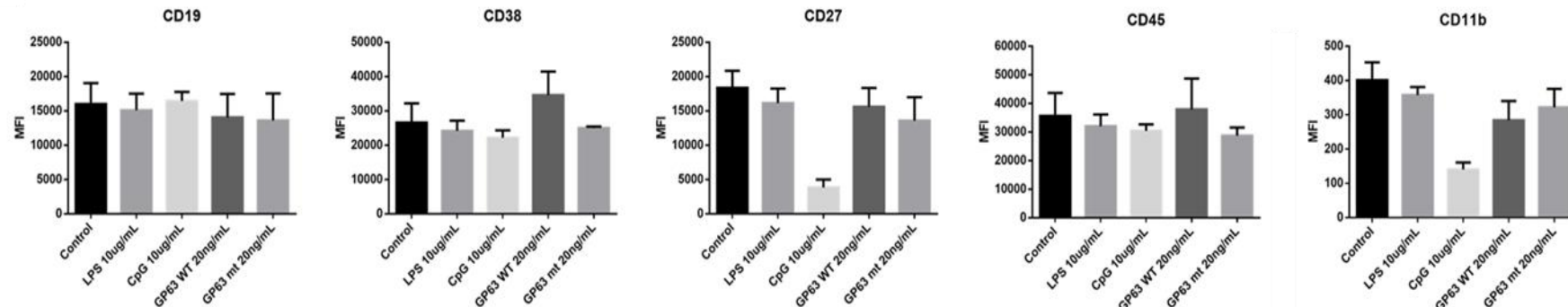


Figura 22 Perfil de activación de linfocitos B Ramos estimulados con LPS, PMA, CpG y GP63 recombinante.

Distribución y cuantificación de las proteínas CD19, CD38, CD27, CD45 y CD11b expuestas a 10µg/mL de LPS, 50ng/mL de PMA, 10µg/mL de CpG y 20ng/mL de GP63 WT o mt durante 24h. **A)** Histograma de la expresión cada marcador, los colores representan las diferentes condiciones de activación. **B)** Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) para cada molécula. Los datos (n=2) réplicas biológicas están representados por la media.

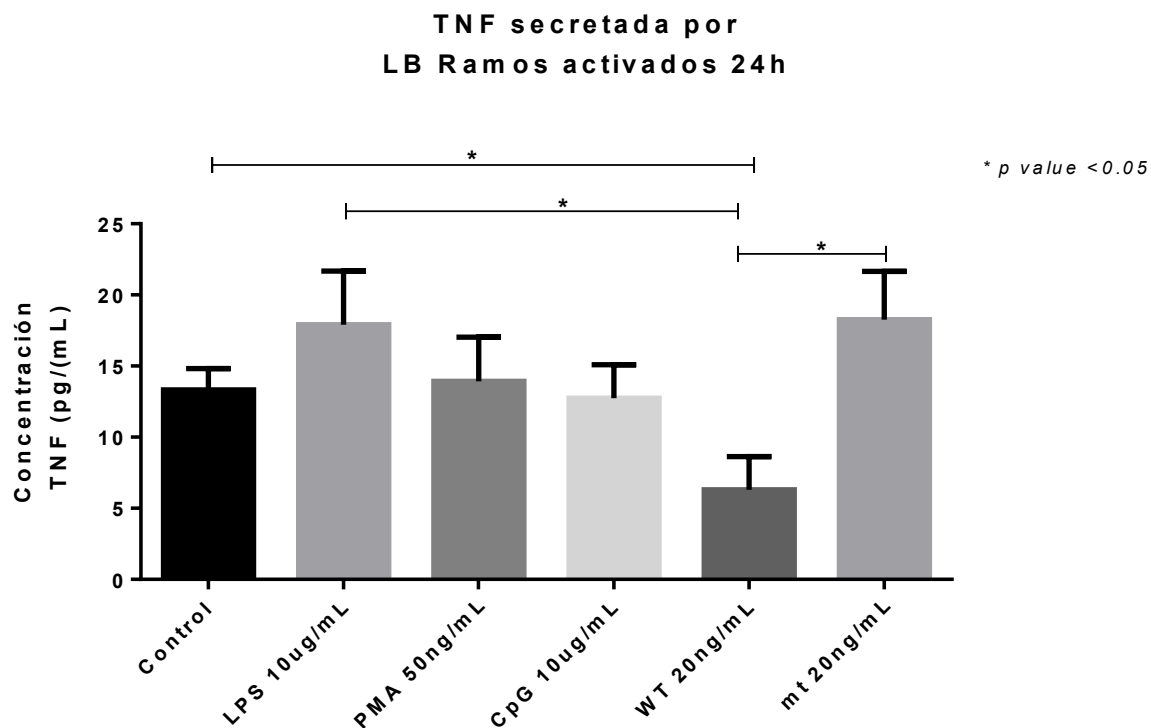


Figura 23 Detección de TNF en linfocitos B Ramos activados con LPS, PMA, CpG y GP63 recombinante.

Ensayo inmuno enzimático (ELISA) de cuantificación de TNF en el sobrenadante de LB Ramos expuestos a 10µg/mL de LPS, 50ng/mL de PMA, 10µg/mL de CpG y 20ng/ml de GP63 WT/mt durante 24h. El límite de detección de la prueba (7.8pg/mL-500pg/mL). Los datos representan (n=4) réplicas experimentales. La prueba estadística aplicada es test Mann Whitney con un valor de significancia *p<0.05.

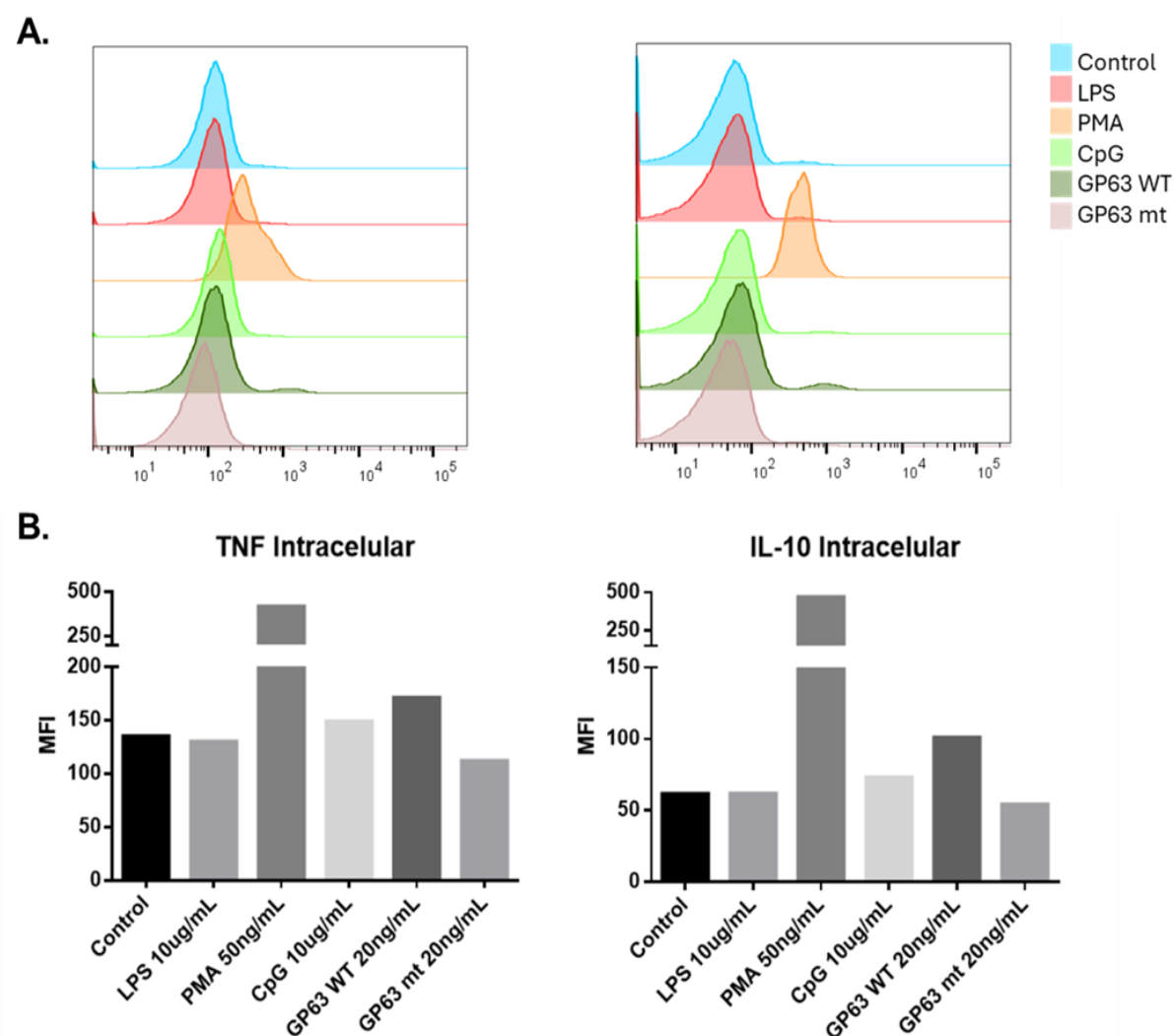


Figura 24 Detección de TNF e IL-10 intracelular en linfocitos B Ramos estimulados con LPS, PMA, CpG y GP63 recombinante.

Distribución y cuantificación de las citoquinas TNF e IL-10 expuestas a 10 μ g/mL de LPS, 50ng/mL de PMA, 10 μ g/mL de CpG y 20ng/ml de GP63 WT/mt durante 4h, con posterior tratamiento con Brefeldina A por 2 horas. **A)** Histograma de la expresión de las citoquinas con cada estímulo, los colores representan los diferentes activadores utilizados. **B)** Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de la detección de las citoquinas intracelularmente.

7.3.2 Transducción de Linfocitos B Ramos y MNSP con el lentivirus (LV-MND-GP63) Parte 1

Luego de analizar los efectos de la proteína GP63 en su forma recombinante, el objetivo en esta etapa fue evaluar el impacto de su expresión intracelular. Para ello, se realizó la transducción de células B Ramos utilizando un lentivirus codificante para GP63 en sus formas WT y mt, empleando una multiplicidad de infección (MOI) de 5 y 2. Posteriormente, se evaluaron los posibles efectos citotóxicos y las alteraciones en la supervivencia celular en los días 5 y 8 post transducción.

7.3.2.1 La viabilidad de los LB Ramos transducidos con el lentivirus LV-MND-GP63 WT disminuye de forma tiempo y dosis dependiente.

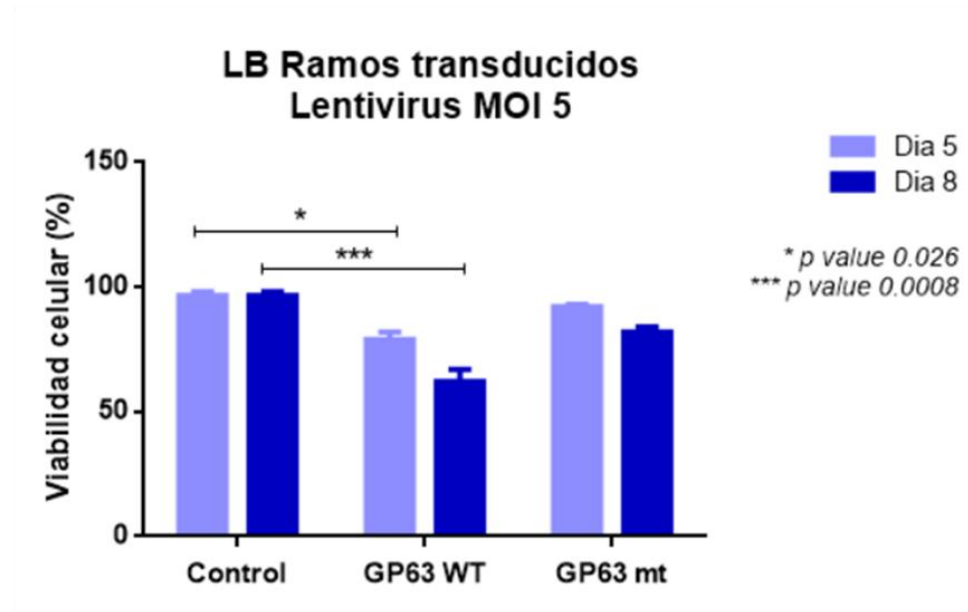
Se observó una disminución de aproximadamente 30–40% en la viabilidad celular tras la transducción de los linfocitos B Ramos con el lentivirus LV-MND-GP63 WT al día 5 (Figura 25 A). Asimismo, se evidenció una reducción en el número total de células en el cultivo (Figura 25 B). Con el fin de caracterizar el tipo de muerte celular inducida, se empleó la tinción combinada de 7AAD y Apotracker™, lo que permitió discriminar entre apoptosis temprana, tardía y necrosis celular. A partir de estos marcadores se cuantificaron los diferentes subtipos de muerte celular, determinando que la caída de la viabilidad se asocia principalmente con un aumento en eventos de tipo apoptótico. Al día 5 post transducción con el LV-MND-GP63 WT el 63.8% de LB Ramos eran completamente viables, y el 6.28% estaba en apoptosis temprana, el 25.7% en apoptosis tardía y el 2.4% en necrosis (Figura 26 AB). Este fenómeno aumenta con el paso del tiempo, siendo al día 8 post transducción solo un 47.3% de los LB Ramos viables, un 6.87% en apoptosis temprana, un 40.3% en apoptosis tardía, y un 5.56% en necrosis (Figura 26 CD).

Considerando la posibilidad de que la dosis empleada de lentivirus fue muy alta y podía estar siendo citotóxica para la célula, se recrea el experimento con un MOI inferior (MOI 2), encontrando que la muerte celular persiste, pero la magnitud del

daño es la mitad de lo observado con el MOI 5. Para el quinto día post transducción el porcentaje de células viables fue 75.9%, en apoptosis temprana 3.32%, 14.6% de apoptosis tardía, y necrosis 6.23% (Figura 26 EF). Al octavo día se encontraron 61.7% de células viables, 3.83% en apoptosis temprana, un 26.6% de apoptosis tardía, y un 7.90% en necrosis (Figura 26 GH).

Adicionalmente, se observaron diferencias morfológicas marcadas entre las condiciones experimentales. En el control, las células presentaban un crecimiento en suspensión, con morfología redondeada y sin signos evidentes de muerte celular. En contraste, los linfocitos B Ramos transducidos mostraban una disposición en racimos, pérdida de integridad de membrana, retracción y fragmentación nuclear, presencia de vacuolas citoplasmáticas y exposición del material genético. Estos resultados son compatibles con muerte celular programada, específicamente apoptosis (Figura 27).

A.



B.

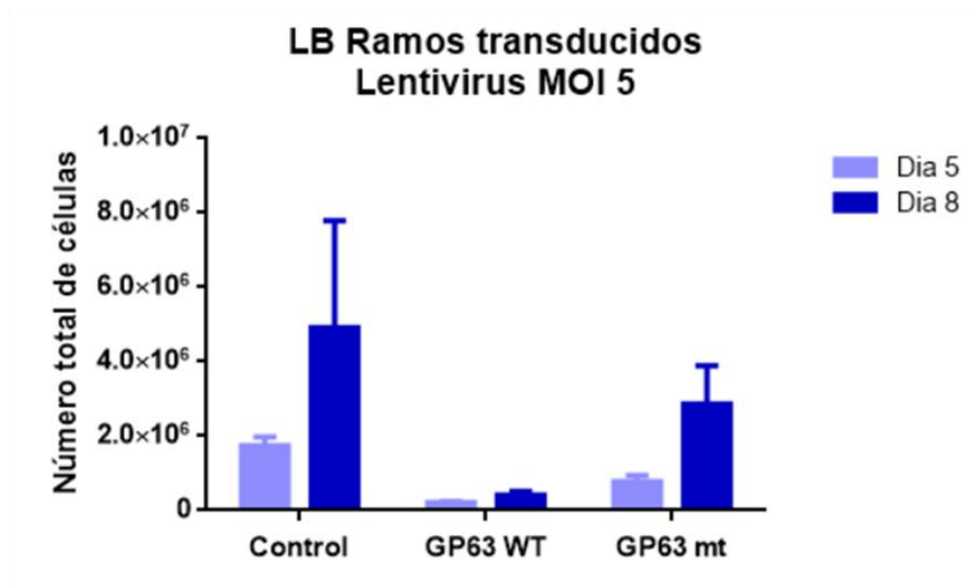
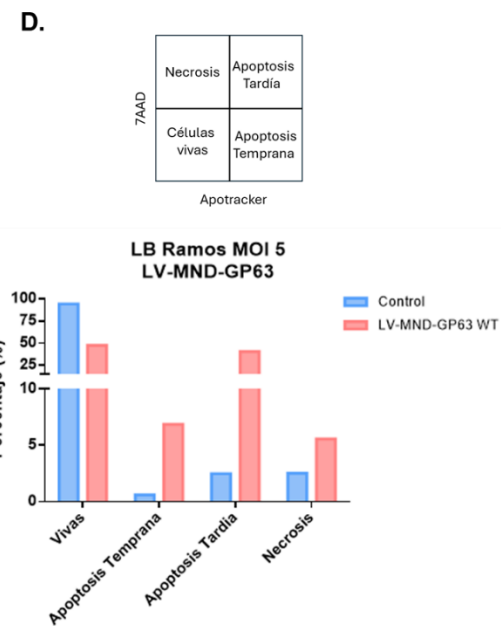
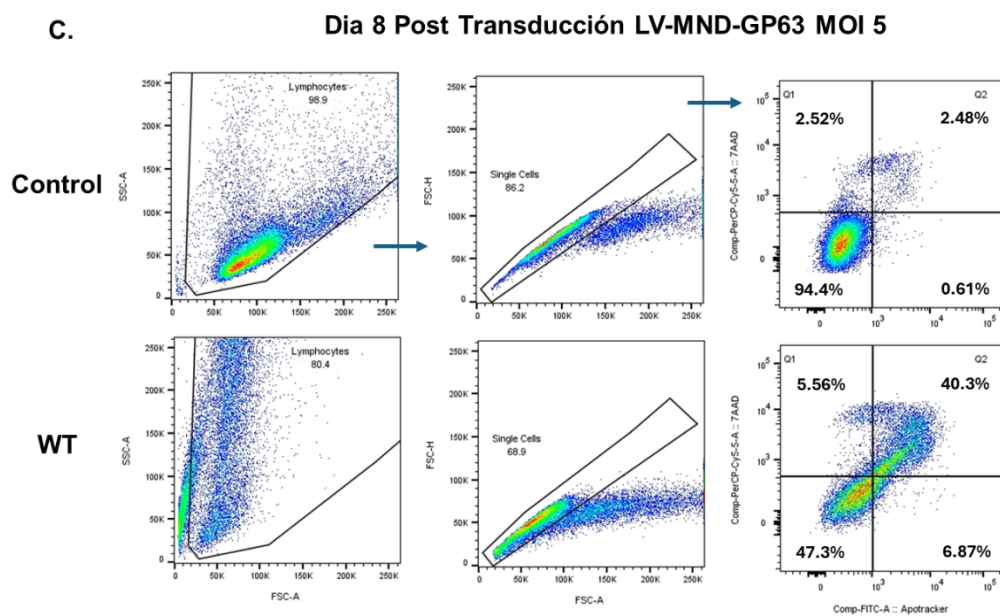
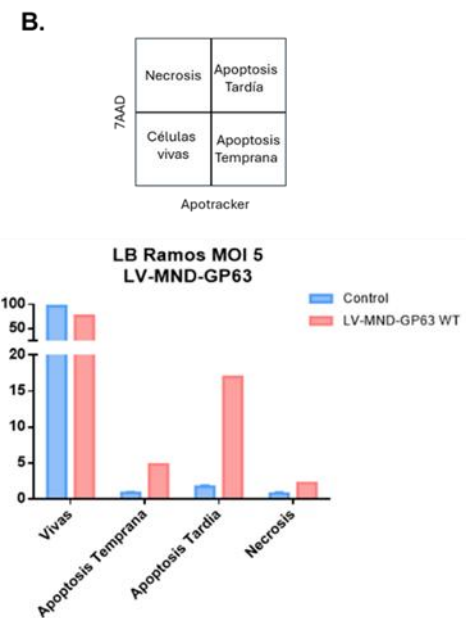
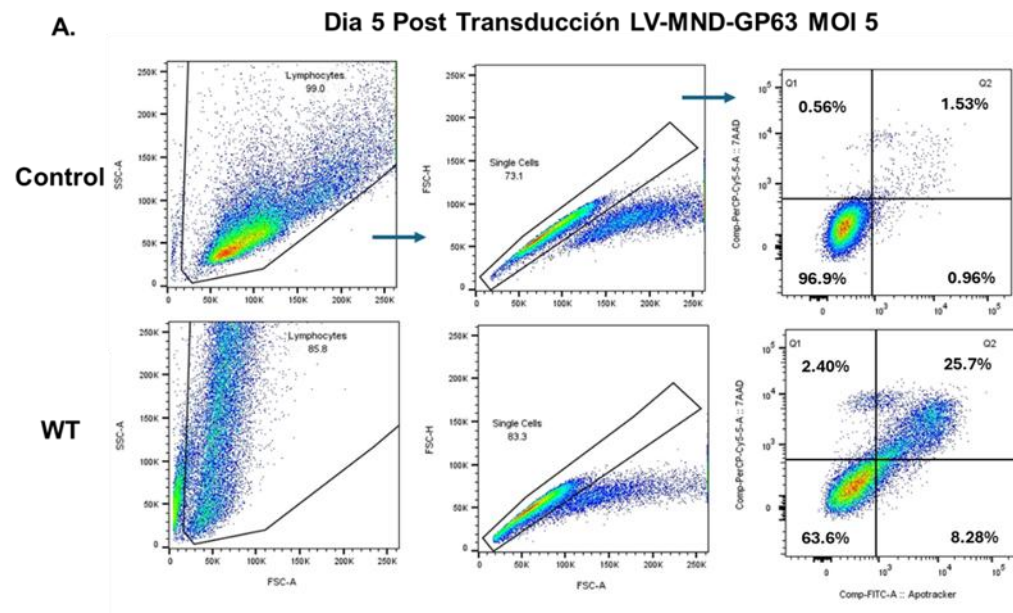


Figura 25 La viabilidad celular de los Linfocitos B Ramos disminuye por efecto del LV-MND-GP63 WT.

Linfocitos B Ramos transducidos a un MOI 5 con LV-MND-GP63 WT y mt, determinación de la viabilidad celular al día 5 y 8 post tratamiento. Ensayo en placa con 1x10⁶ c/pozo. **A)** Porcentaje de células viables. La prueba estadística aplicada es test Mann Whitney con un valor de significancia **p*<0.05 **B)** Cuantificación del número total de células en el cultivo, se realiza con azul de tripán en contador automático comprobado con conteo manual en cámara de neubauer.



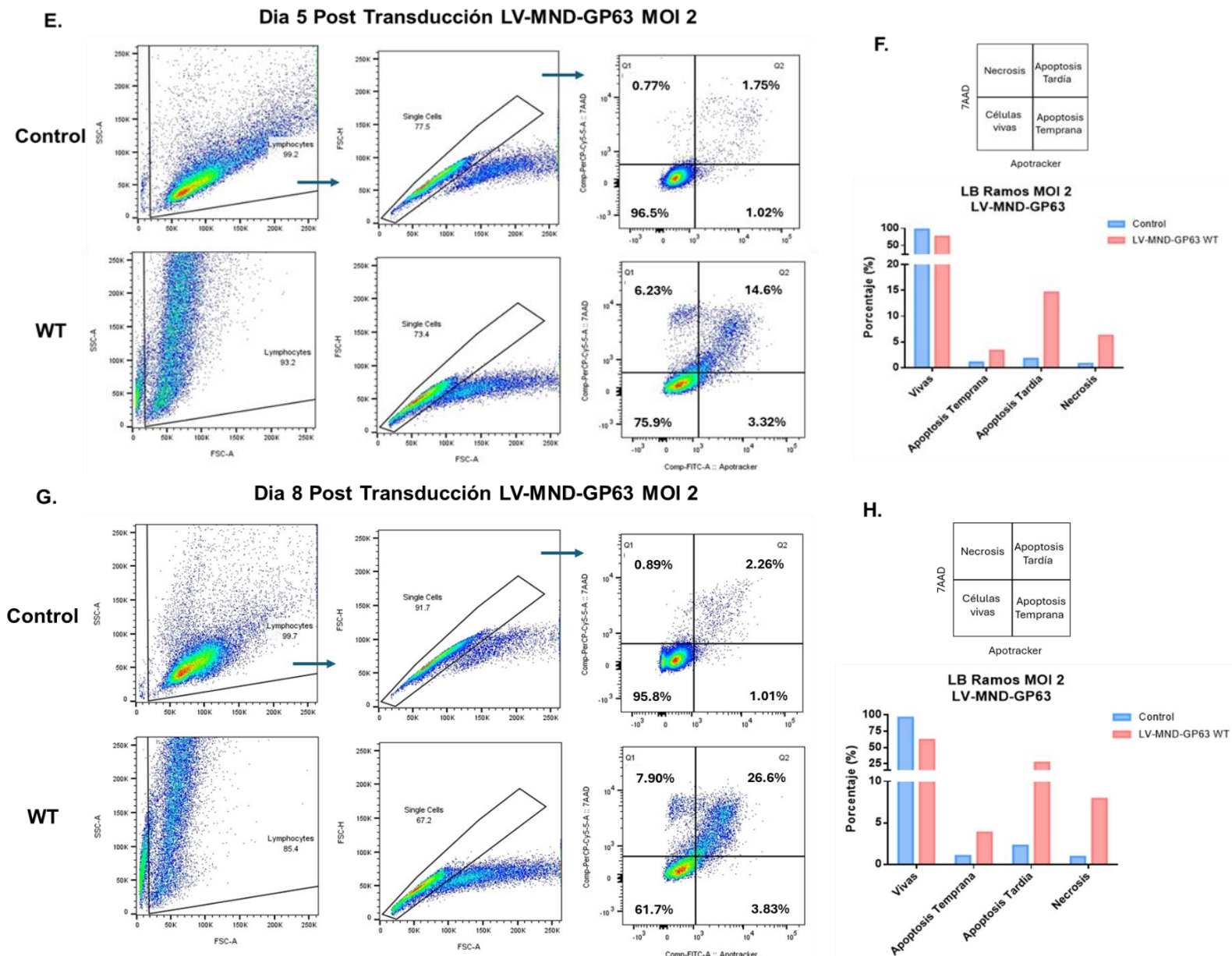


Figura 26 Clasificación de tipo de muerte celular en LB Ramos transducidos con LV-MND-GP63. Distribución y cuantificación de las poblaciones celulares teñidas con 7AAD y Apotracker™ al día 5 y 8 post transducción a un MOI de 5 y 2. **A-C-E-G)** Dotplots de las poblaciones de linfocitos **B-D-F-H)** Porcentaje de células vivas, en apoptosis temprana, tardía y en necrosis celular.

LB Ramos transducidos con LV-MND-GP63 Dia 8

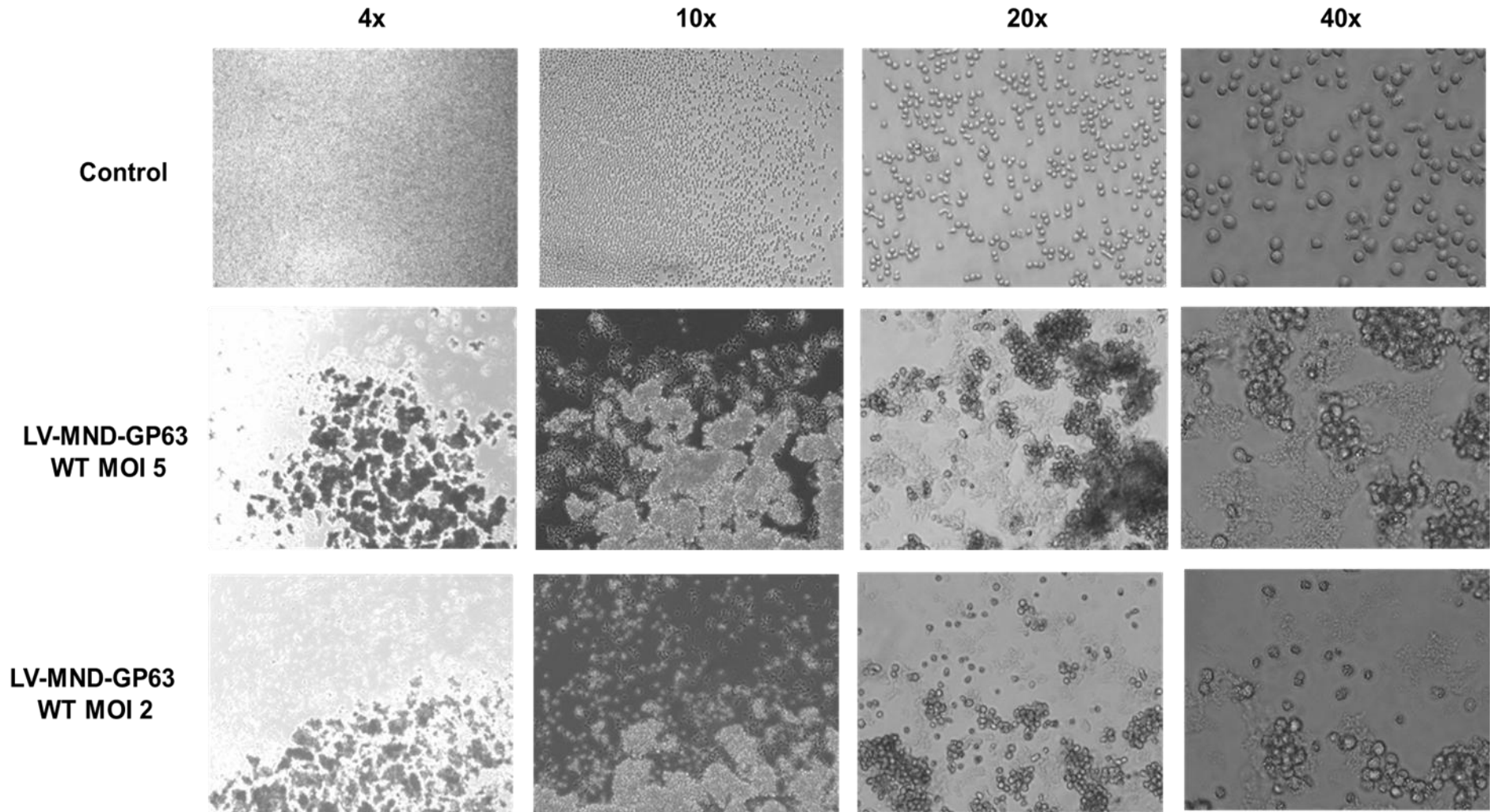


Figura 27 Evaluación morfológica mediante microscopia de luz de cultivos de LB Ramos transducidos con LV-MND-GP63 WT.

Las imágenes sugieren que la transducción con el lentivirus que expresa la proteína WT induce cambios morfológicos y muerte celular. Observación por microscopio invertido de luz. **Panel superior:** control sin tratamiento, **Panel central:** LB Ramos tratados con el lentivirus a un MOI 5 y **Panel inferior:** LB tratados con el lentivirus a un MOI 2. Objetivos de derecha a izquierda (4x, 10x, 20x y 40x). Estas imágenes corresponden al octavo día post transducción.

7.3.2.2 Diferencias en la eficiencia de transducción: el lentivirus codificante para la proteína WT logra alta integración mientras que el mutante registró una integración nula.

El número de copias del vector integrado por genoma fue determinado mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), con el uso de cebadores específicos para la secuencia del vector, para un gen de referencia y dos estándares conocidos de control. El análisis reveló una relación dosis dependiente, con el LV-MND-GP63 WT (MOI 2) se integraron al menos 2 copias del vector por célula al día 5 y 8 post transducción, este valor es considerado seguro en estudios preclínicos (< 5 copias/célula). Mientras que con el MOI 5 el número de copias por célula fue de 6.49 al día 5 y para el día 8 bajó a 4.39 (Figura 28). Si bien esta tendencia sugiere una integración más eficiente puede representar un alto riesgo de inserciones múltiples asociadas con toxicidad y mutagénesis.

En contraste, el lentivirus codificante para la proteína mutante, como se mencionó en el apartado (6.3.2.1), no mostró integración detectable en el genoma de los LB Ramos transducidos, a pesar de ser cultivados bajo las mismas condiciones, que el lentivirus de la proteína nativa WT. El valor máximo obtenido fue 0.31 (<1 copia/célula) con el MOI 5, ocho días después de la transducción. Esto sugiere una pérdida de su capacidad de infección o integración celular, lo que impide su uso en los experimentos posteriores en LB Ramos.

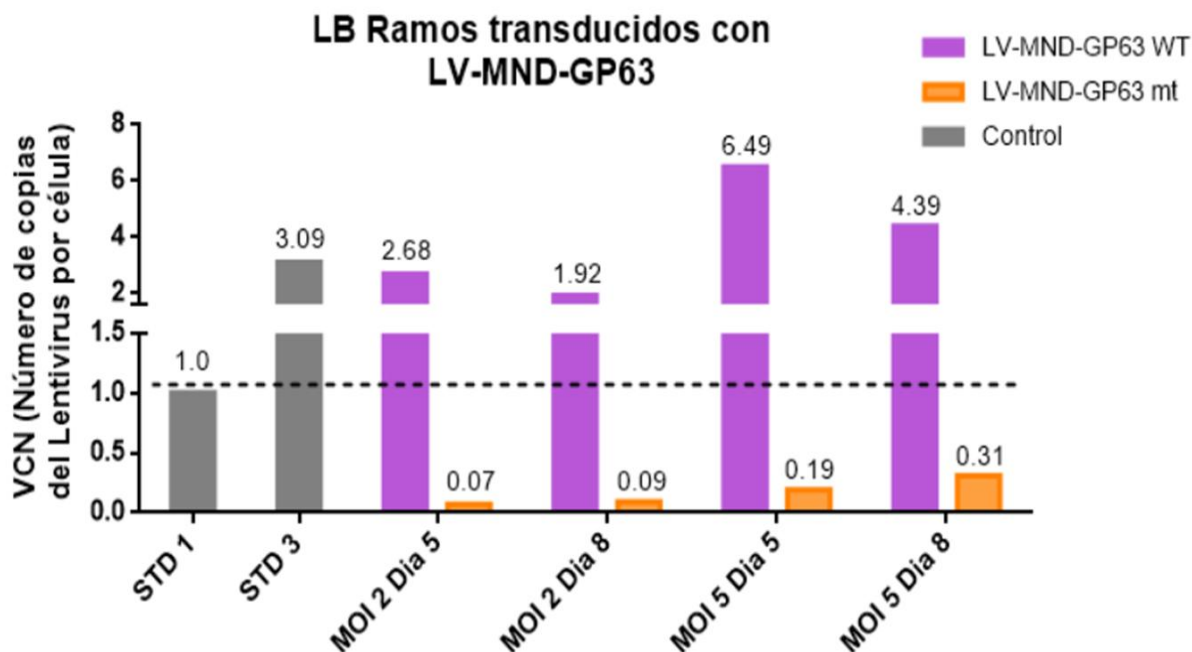


Figura 28 Comparación del número de copias integradas en los LB Ramos transducidos.

Detección del VCN por qPCR cuantitativa del vector (HIV-U5) y gen de referencia (MKL2). Los valores reportados corresponden a observaciones del día 5 y 8 post transducción. En gris están representados los valores de los estándares, en morado el LV-MND-GP63 WT y en naranja el LV-MND-GP63 mt mutante.

7.3.2.3 El control de transducción codificante para la proteína GFP (LV-EF1a-GFP) descarta que la muerte celular sea atribuible al vector, sino que se debe al tipo de proteína expresada GP63.

Para evaluar si la disminución en la viabilidad celular era atribuible al vector o la proteína expresada, se realizó una transducción paralela con un lentivirus control, que codificaba únicamente para la proteína verde fluorescente (GFP). Se evidenció que con esas condiciones no hubo pérdida significativa de la viabilidad celular, indicando que el vector por sí solo no afecta la sobrevivencia de los LB Ramos. Se probaron 4 diferentes MOI (1, 2.5, 5, 10) y la viabilidad celular se mantuvo por

encima del 70% en todas las condiciones al día 5 post transducción (Figura 29). Incluso el porcentaje de GFP intracelular se mantuvo por encima del 80% al día 5 y 8 post traducción (Figura 30 A-B). Por el contrario, el lentivirus codificante para GP63 WT sí indujo la muerte celular por apoptosis de los linfocitos. Estos resultados sugieren que el efecto citotóxico es atribuible a la proteína GP63 y no al sistema lentiviral.

Dia 5 post Transducción con LV-MND-GFP

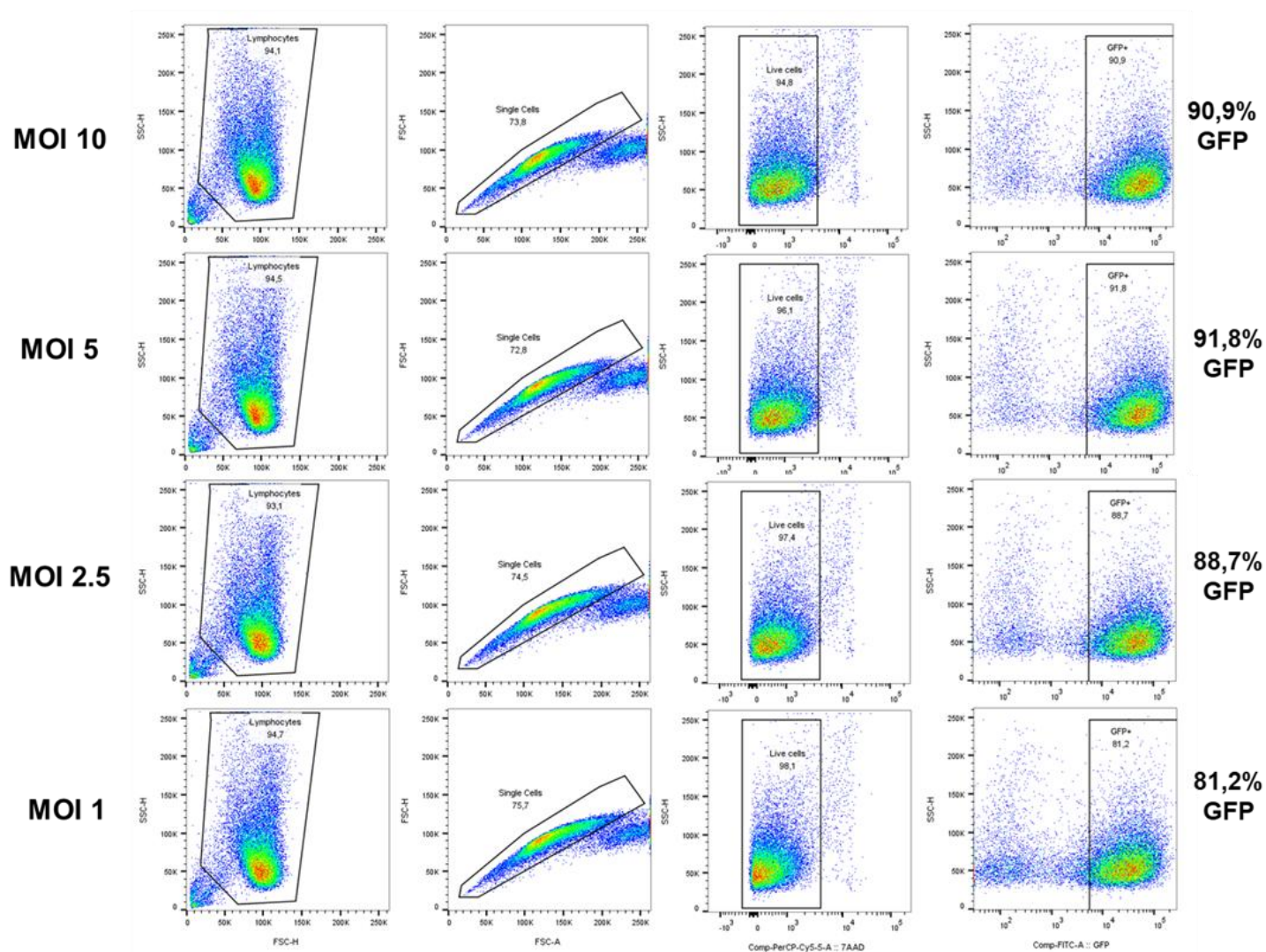


Figura 29 Porcentaje de GFP en LB Ramos transducidos con LV-EF1a-GFP.

Detección de la proteína verde fluorescente por citometría de flujo al día 5 post transducción.

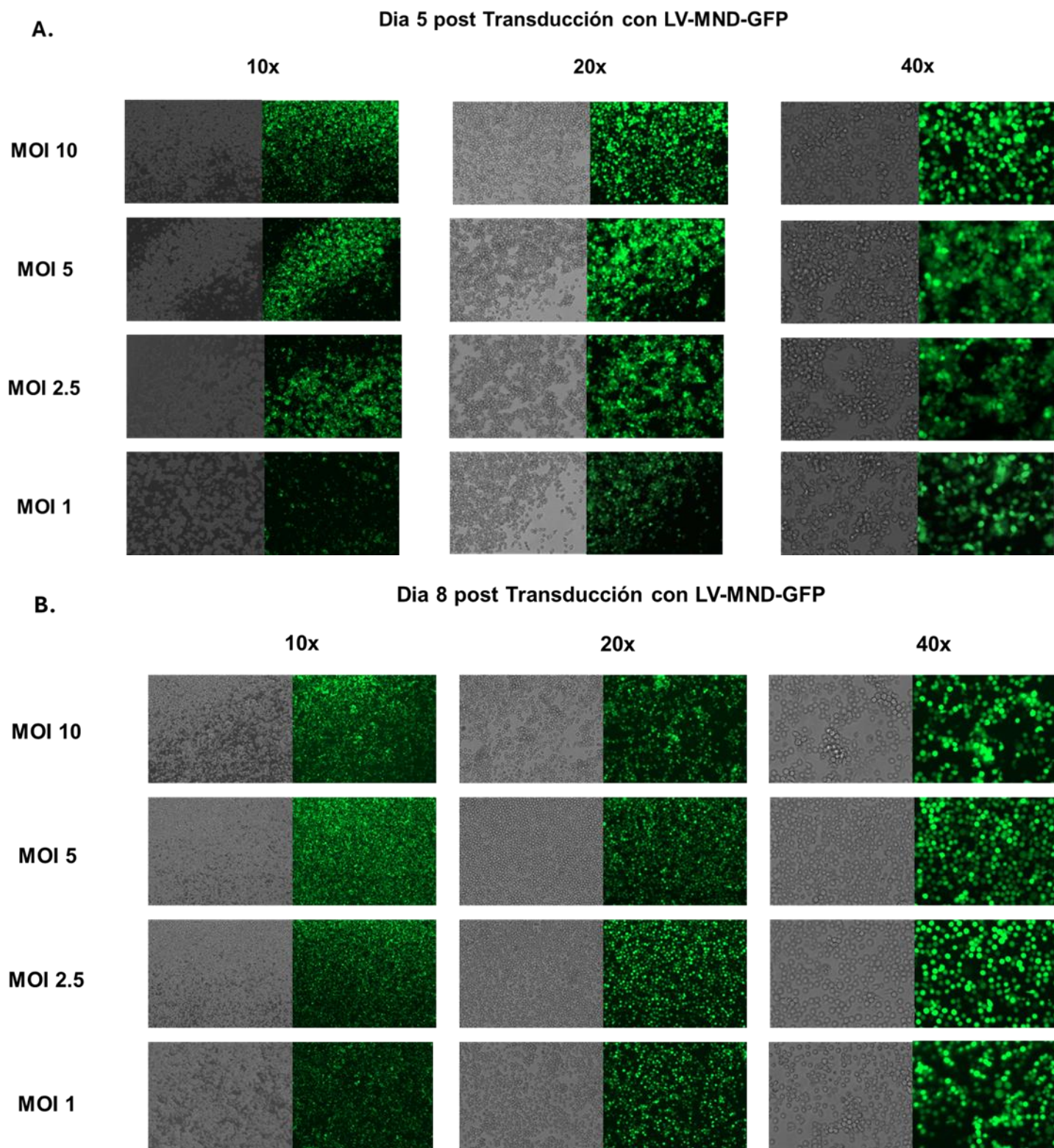


Figura 30 Microscopia de luz y fluorescencia en cultivos de LB Ramos transducidos con LV-EF1a-GFP: Detección intracelular de GFP.

Las imágenes sugieren que la transducción con el lentivirus que expresa GFP no induce cambios morfológicos ni muerte celular. Observación por microscopio invertido de luz (ML) y fluorescencia (MF). MOI 10, 5, 2.5 y 1. **A)** Día 5 post transducción representado ML:MF. **B)** Día 8 post transducción. Objetivos de derecha a izquierda (10x, 20x y 40x).

7.3.2.4 La proliferación de LB Ramos en cultivo es inhibida de forma MOI-dependiente, por la transducción con el LV-MND-GP63 WT

Posterior a la transducción observamos que no solo se reducía de forma progresiva la viabilidad de los linfocitos, sino también una aparente inhibición de su capacidad proliferativa. Para evaluar este efecto, se realizó un seguimiento de los LB Ramos transducidos a diferentes MOI durante un periodo de 14 días. A lo largo de este tiempo, se evidenció una disminución en la densidad celular y una ausencia de la expansión típica esperada en el cultivo, comparado con un control sin estímulo y con un control de transducción (lentivirus codificante para GFP). Este efecto fue dependiente de la cantidad de virus empleado, ya que a mayor MOI se observó una mayor inhibición en la proliferación celular (Figura 31 A), sugiriendo que el impacto funcional y citotóxico está asociado a la dosis del lentivirus y a la expresión de la proteína GP63 WT (Figura 31 B).

Adicionalmente, se observó que el medio de cultivo transducido con el LV-MND-GP63 WT permanecía con su color original rojizo por más tiempo, a diferencia de los controles, que viraban rápidamente a tonalidades amarillas como indicativo del metabolismo celular activo (Figura 31 C). También al observar los cultivos en microscopio invertido de luz y fluorescencia, se evidenció la poca confluencia celular dosis dependiente, siendo la de MOI 5 más baja en comparación con las otras condiciones día tras día. Esto sugiere una menor actividad metabólica asociada a la escasa proliferación, en las condiciones de mayor MOI en la que se expresa la proteína GP63, mientras que con el lentivirus de GFP no hubo muerte celular, ni inhibición en la proliferación y se mantuvo la transducción estable hasta el día 14 (Figura 32), estableciendo que la transducción *per se* no alteraba estas características, sino que era un fenómeno mediado específicamente por la proteasa GP63.

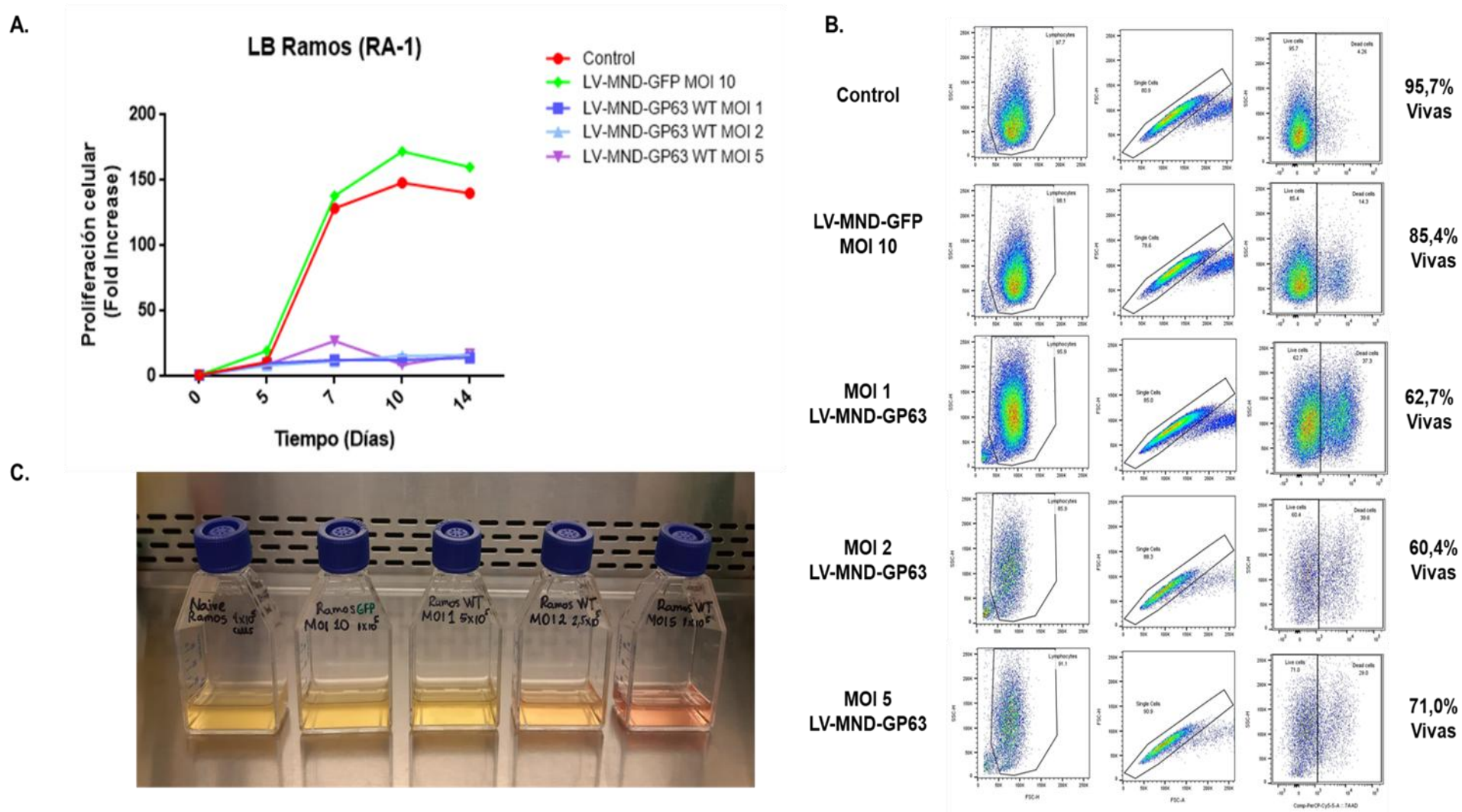


Figura 31 La proliferación y viabilidad celular de los LB Ramos disminuye MOI-dependiente por efecto del LV-MND-GP63 WT.

Linfocitos B Ramos transducidos con MOI 1, 2 y 5 con LV-MND-GP63 WT, y MOI 10 con LV-EF1a-GFP. **A)** Fold-increase de cuantificación total de células en el cultivo para determinar proliferación celular, seguimiento realizado por 14 días. Representado en rojo el control sin estímulo, en verde el control de transducción, azul oscuro MOI 1, azul claro MOI 2, y morado MOI 5. **B)** Dotplots del porcentaje de viabilidad de los LB Ramos por citometría de flujo, evaluación del marcador 7AAD al día 7 post transducción. **C)** Fotografía día 7 post transducción de los frascos de cultivos celulares. De izquierda a derecha, el control sin estímulo, control de transducción MOI 10 GFP, MOI 1, 2 y 5 de GP63. Se observa la diferencia en el color del medio de cultivo, reflejo de la actividad metabólica celular.

LB Ramos post transducción (40X)

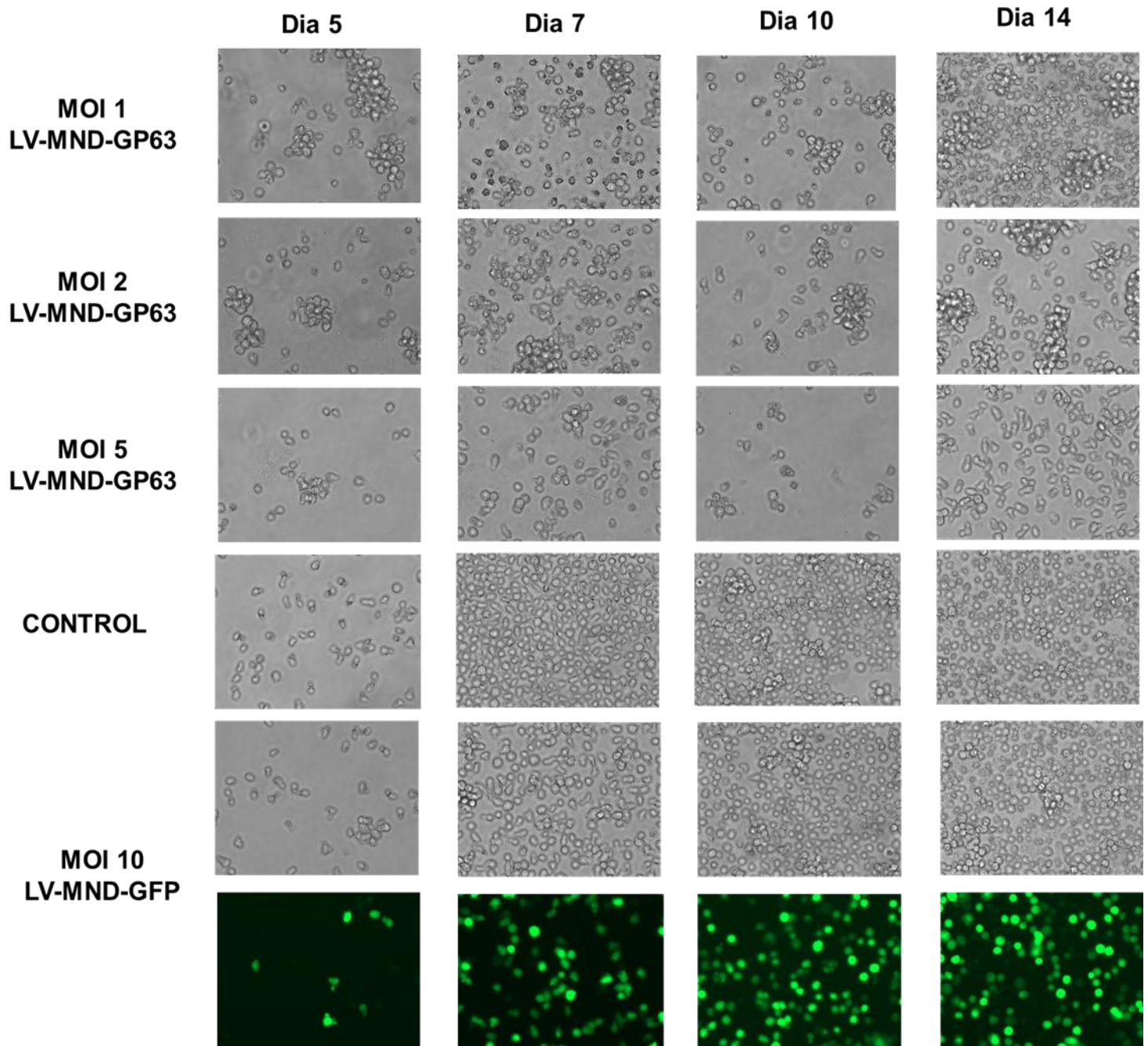


Figura 32 Microscopia de luz y fluorescencia de LB Ramos transducidos: la proliferación y muerte celular son MOI-dependiente.

Las imágenes representan la observación por 14 días de los cultivos celulares transducidos con LV-MND-GP63 WT con: **Fila 1** MOI 1, **Fila 2** MOI 2, y **Fila 3** MOI 5; **Fila 4** control sin estímulo y **Fila 5** control de transducción con LV-EF1a-GFP MOI 10 con sus fotos espejo de microscopia invertida de luz (ML) y fluorescencia (MF). De izquierda a derecha las fotos representan los días de observación 5, 7, 10 y 14. Objetivo de (40x)

7.3.2.5 El número de copias del vector (VCN) en los LB Ramos transducidos con LV-MND-GP63 mostró una integración proporcional al MOI y una disminución progresiva con el tiempo.

Los valores de número de copias del vector por célula (VCN), determinados mediante qPCR cuantitativa, evidenciaron una integración dependiente de la dosis. Al día 5 post transducción, se observaron VCN de 1.34, 5.25 y 6.58 para los MOI de 1, 2 y 5, respectivamente. Sin embargo, al día 10 se registró una disminución significativa en el VCN, con valores de 0.05 (MOI 1), 0.2 (MOI 2) y 3.48 (MOI 5). Esta reducción se asocia a una alta tasa de muerte celular en las primeras fases post transducción; las células que integran el lentivirus y expresan intracelularmente la proteína GP63 son eliminadas, mientras que aquellas que no expresan la proteína sobreviven y repueblan el cultivo. En contraste, las células transducidas con el lentivirus control que expresa GFP, a pesar de presentar un VCN más bajo (0.7 al día 5 y 0.16 al día 10), mantienen la viabilidad celular, lo que permite una persistencia más estable de la población transducida a lo largo del tiempo (Figura 33).

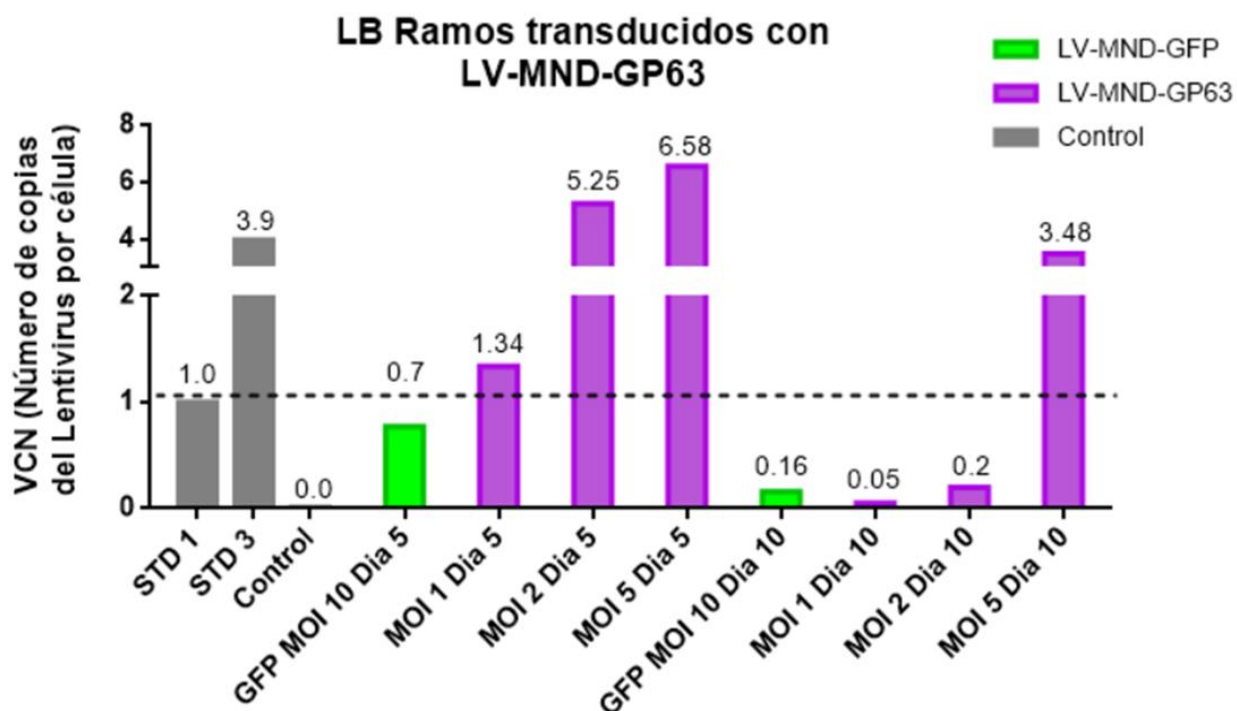


Figura 33 Número de copias del vector (VCN) de LB Ramos transducidos con LV-MND-GP63 WT, mostró una integración proporcional al MOI.

Detección del VCN por qPCR cuantitativa del vector (HIV-U5) y gen de referencia (MKL2). Los valores reportados corresponden a observaciones del día 5 y 10 post transducción. En gris están los representados los valores de los estándares, en verde la transducción con LV-EF1a-GFP, y en morado el LV-MND-GP63 WT. El día 5 se observa la integración MOI dependiente y al día 10 una pérdida de la integración del vector.

7.3.2.6 La producción de IgM, TNF e IL-6 es significativamente baja en los LB Ramos transducidos con el LV-MND-GP63 WT

Los sobrenadantes de los LB Ramos transducidos con el lentivirus codificante para la proteína GP63 WT no mostraron producción detectable de la citoquina IL-6, y los niveles de TNF (<7.8pg/mL) se encontraron por debajo del umbral mínimo de detección establecido por el ensayo inmunoenzimático (ELISA) utilizado, por lo que se consideraron no cuantificables. En cuanto a la producción de la IgM, se observó

una disminución significativa y MOI dependiente en los sobrenadantes de los LB Ramos transducidos con una concentración de 120pg/mL con MOI 2 y para MOI 5 79pg/mL, en comparación con el control de transducción (GFP MOI 10 407pg/mL) y el control sin estímulo (800pg/mL). Estos resultados sugieren que la transducción con el lentivirus codificante para GP63 WT regula negativamente la capacidad de secretar IgM en ausencia de otros estímulos (Figura 34).

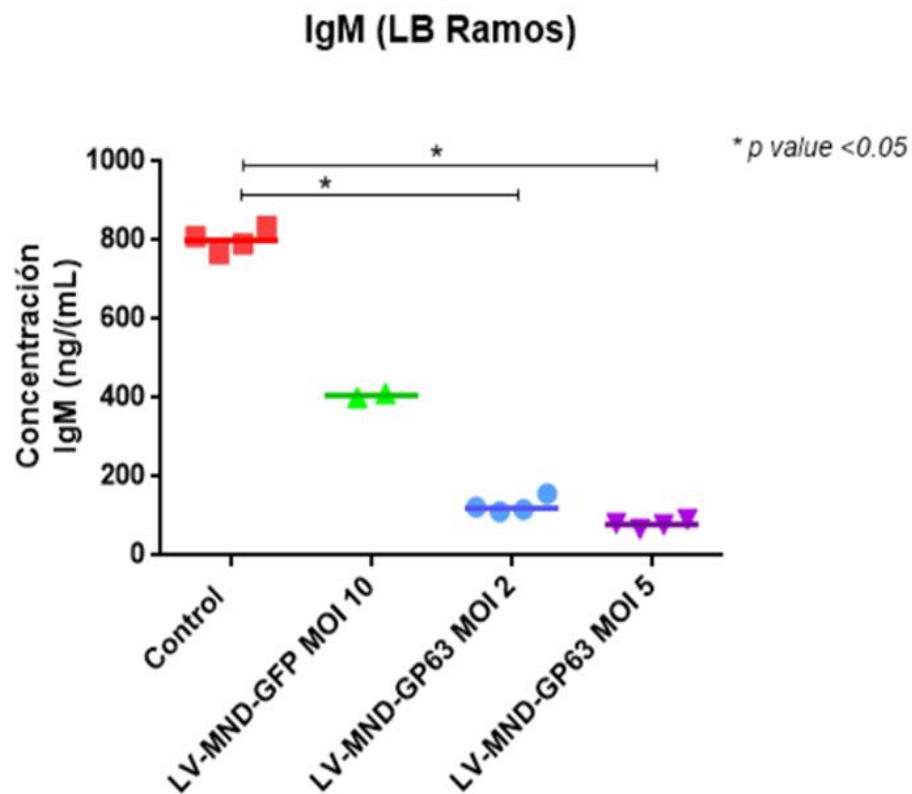


Figura 34 Concentración de IgM en LB Ramos transducidos con LV-MND-GP63 WT.

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la cuantificación de IgM soluble en sobrenadante de LB Ramos transducidos con LV-MND-GP63 WT y LV-EF1a-GFP, las mediciones se realizan al día 5 post transducción (n=4 réplicas experimentales). En **rojo** se reporta el control sin estímulo, en **verde** el control de transducción, en **azul** MOI 2 y en **morado** MOI 5. La prueba estadística aplicada es test Mann Whitney con un valor de significancia * p <0.05.

7.3.2.7 Al día 5 y 7 post transducción con LV-MND-GP63 WT en los LB Ramos hay aumento en la expresión de CD11b y no de CD38.

Del mismo experimento de seguimiento por 14 días de los LB Ramos transducidos, los días 5 y 7 se evaluaron los marcadores CD19, CD38, CD40, HLA-DR, y CD11b, encontrando que, a diferencia de lo evidenciado con la proteína GP63 recombinante, en estas células transducidas no hubo aumento de CD38. Tampoco hubo diferencias en la expresión de HLA-DR y el marcador CD19 obtuvo niveles bajos con respecto a los controles, con una leve tendencia MOI dependiente, pero sin llegar a superar el valor de los controles al día 7. El CD40 al día 5 era levemente superior a los controles, pero al día 7 hay una caída general de la expresión de esta molécula (Figura 35).

Finalmente, el resultado más llamativo fue la alta expresión de CD11b con respecto a los controles, tanto para el día 5 como para el día 7 post transducción. Estos hallazgos difieren de lo observado previamente con la proteína recombinante, lo que sugiere que la expresión intracelular de GP63 podría estar activando rutas distintas o generando un entorno celular particular, vinculado a procesos específicos de la maquinaria intracelular de los LB.

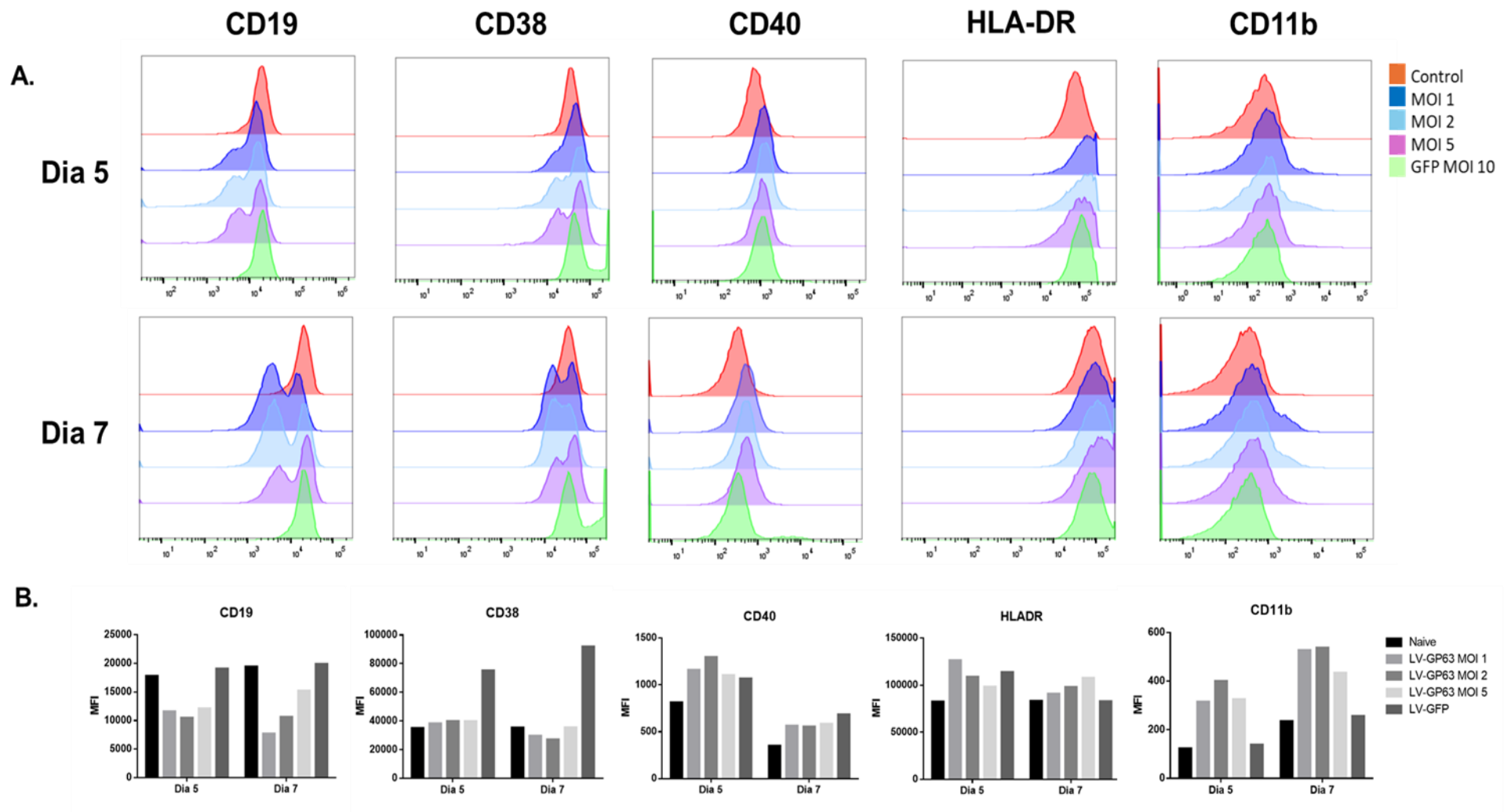


Figura 35 Expresión de marcadores extracelulares en LB Ramos transducidos con LV-MND-GP63 WT.

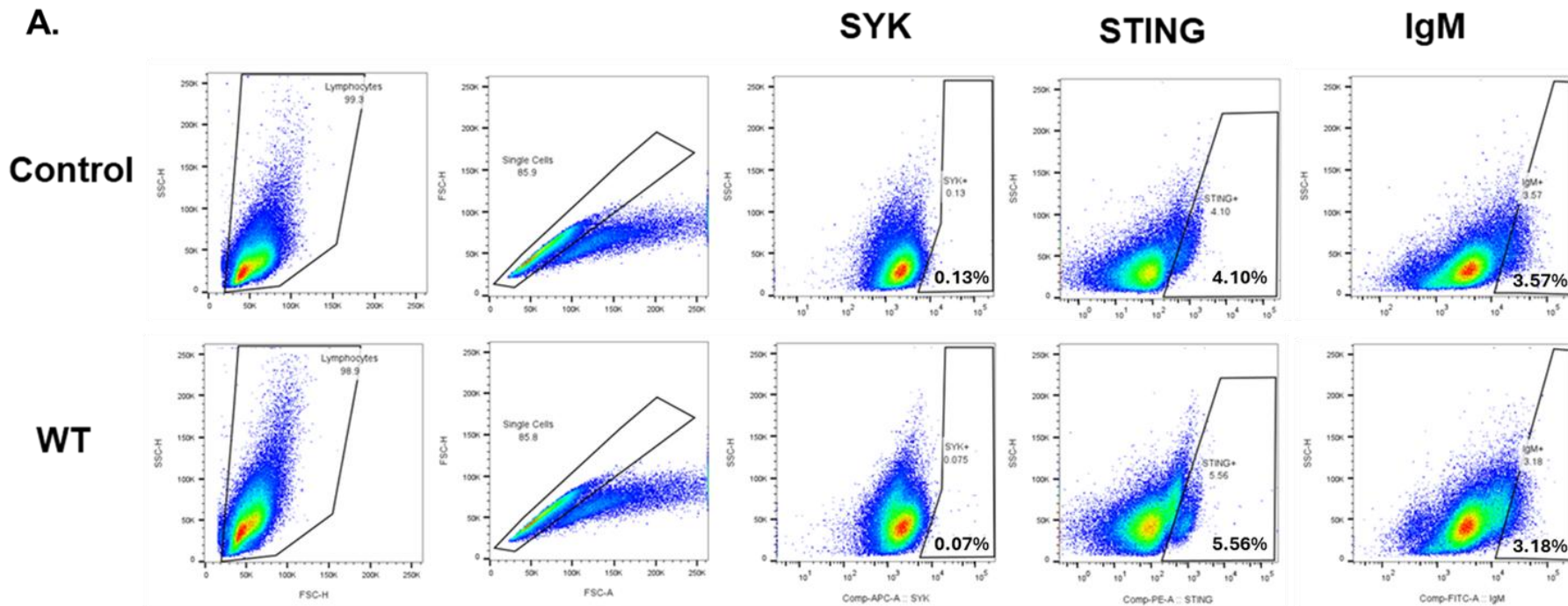
Distribución y cuantificación de las proteínas CD19, CD38, CD40, HLA-DR y CD11b. Los datos corresponden al día 5 y 7 post transducción. **A)** Histograma de la expresión cada marcador, los colores representan las diferentes condiciones experimentales. **B)** Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) para cada molécula.

Con el objetivo de realizar ensayos funcionales y de activación en una población celular que exprese GP63 de forma intracelular y conserve la viabilidad para su estudio a largo plazo, se transducen nuevamente linfocitos B Ramos utilizando un MOI reducido de 0.5. Para optimizar los niveles de integración lentiviral, se llevaron a cabo dos rondas consecutivas de transducción, complementadas con la adición de Polybrene® (5 µg/mL) como potenciador de la eficiencia infecciosa.

7.3.2.8 Perfil de activación intracelular: Expresión de Syk, STING, e IgM total al día 3 y 7 post transducción.

Luego de la transducción en los LB Ramos, se evaluaron diferentes proteínas implicadas en la señalización intracelular con la finalidad de conocer si eran moduladas por GP63. La proteína Syk que participa en la activación clásica a través del BCR en los LB, no presentó ningún cambio significativo con relación al control sin estímulo, ni al día 3 ni al día 7 post transducción (Figura 36). Esta medición se basó en la detección de Syk total así que no es posible concluir acerca de su actividad funcional, por lo tanto, en cuanto a la presencia de la proteína, no hubo diferencia. De igual forma, la detección de IgM total al día 3 post transducción no presentó diferencias con respecto al control (Figura 36 A), sin embargo, el día 7 aumentó el doble comparado con el control (Figura 36 B). Por otro lado, la molécula STING, un sensor citosólico de ADN, mostró niveles de expresión elevados con una tendencia dependiente del tiempo. La intensidad media de fluorescencia (MFI) aumentó de 150 al día 3 a 400 al día 7 post transducción (Figura 36 C-D), con una relación aproximada de 2:1 en comparación con el control. Aunque la expresión de GP63 fue inducida mediante un vector lentiviral, lo que podría, en principio, afectar la expresión de STING por la introducción de material genético exógeno, los datos indican que los efectos observados no son atribuibles al vector en sí, sino a la actividad funcional de la proteasa GP63. Su expresión intracelular genera un estado de estrés celular que no se observa en células transducidas con un vector lentiviral equivalente que expresa la proteína GFP.

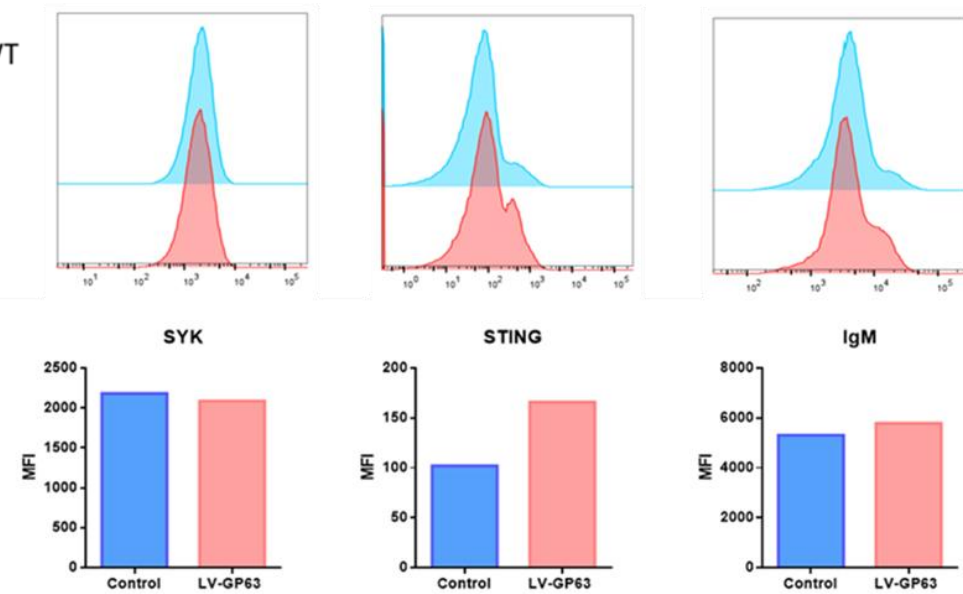
Día 3 post transducción MOI 0.5



B.

Control

GP63 WT



Día 7 post transducción MOI 0.5

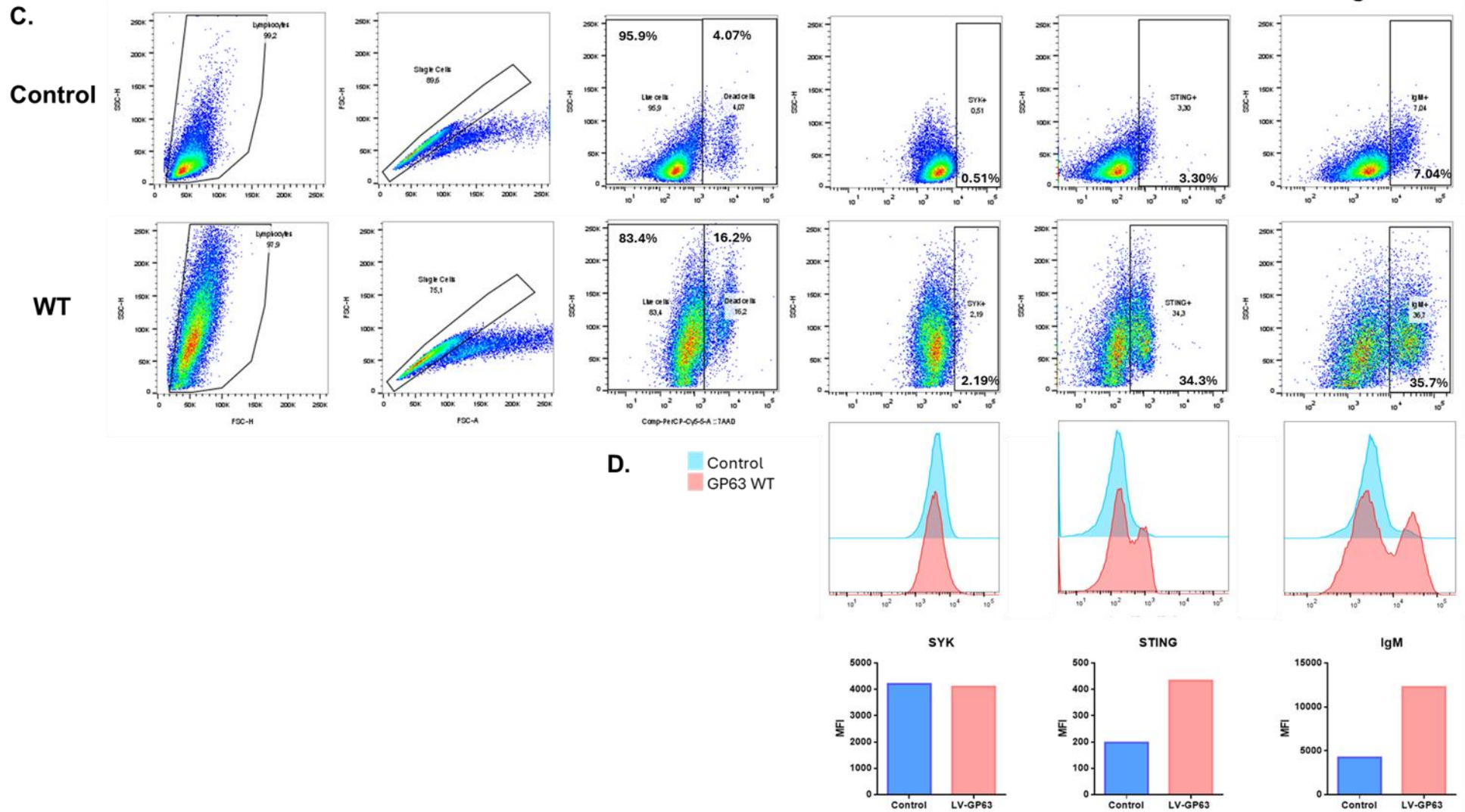


Figura 36 Expresión de marcadores intracelulares en LB Ramos transducidos con LV-MND-GP63 WT. Distribución y cuantificación de Syk, STING e IgM total. Los datos corresponden al día 3 y 7 post transducción. **A y C)** Dotplots de la expresión cada proteína con sus porcentajes por población. **B y D)** Histogramas y cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) para cada molécula.

7.3.2.9 La muerte celular de los LB Ramos inducida por GP63 intracelular, podría estar asociada a la activación de la vía apoptótica mediada por la Caspasa 3.

En esta cohorte de transducción también se evaluó la muerte celular mediante citometría de flujo con Apotracker™ y 7AAD para identificar la apoptosis temprana, tardía y necrosis celular. También se realizó la detección de la Caspasa 3 como marcador adicional de apoptosis. Al día 3 post transducción se obtuvieron LB Ramos con una viabilidad de 86.7%, un 4.21% en apoptosis temprana, el 1.58% en apoptosis tardía, 7.48% en necrosis, y los niveles de Caspasa 3 presentaron un MFI de 608. Desafortunadamente, el control sin transducción de esa medición se perdió durante los lavados en la tinción de citometría, sin embargo, los datos del día 7 tienen valores de MFI similares, lo que nos permite asociar que desde una fase temprana comienza la activación de las vías apoptóticas, sin generar una muerte instantánea o que predominan mecanismos compensatorios, de adaptación al estrés causado por la transducción lentiviral. Para el día 7 se observa una población de células vivas en un 34.6%, en apoptosis temprana el 19.5%, en apoptosis tardía el 41.2% y en necrosis el 4.80% (Figura 37). Los valores de MFI de Caspasa 3 fueron de 368, tres veces más que el control sin estímulo. Esta caspasa es la responsable de la escisión de moléculas que conducen al fenómeno de apoptosis, con fragmentación del ADN, condensación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos, los cuales observamos en evaluaciones por microscopia anteriormente.

7.3.3 Transducción de LB Ramos y MNSP humanos con lentivirus (LV-MND-GP63) Parte 2

7.3.3.1 Correlación inversa entre la expresión intracelular de GP63 y la viabilidad de los LB Ramos

La expresión intracelular de GP63 fue evaluada por citometría de flujo en los días 3, 4, 7, 14 y 21 post transducción en dos réplicas experimentales (WT1 y WT2), realizadas bajo condiciones idénticas y mediciones simultáneas. Mientras que la réplica WT2 mantuvo la viabilidad hasta el día 21, la WT1 no sobrevivió más allá del día 5 post transducción. Al compilar los datos de ambas réplicas, se evidenció un patrón de expresión dependiente del tiempo (Figura 38), alcanzando un pico máximo de intensidad al día 7, seguido de una disminución progresiva. Para el día 21, la expresión de GP63 era indetectable, reflejando la pérdida del transgén y el reemplazo completo de la población transducida por células no transducidas.

Adicionalmente, se observó una correlación inversa entre la expresión de GP63 y la viabilidad celular: a mayor expresión de la proteína, menor porcentaje de células viables (Figura 39), lo que sugiere un efecto dosis-dependiente de GP63 sobre la inducción de muerte celular. Cabe destacar que esta representa la primera evidencia de detección intracelular de GP63 por citometría de flujo en linfocitos B, considerando que la detección de esta proteína mediante anticuerpos ha sido históricamente difícil de lograr.

En conjunto, estos hallazgos apoyan la hipótesis de que la presencia sostenida de GP63 en el citoplasma celular promueve mecanismos de muerte celular programada.

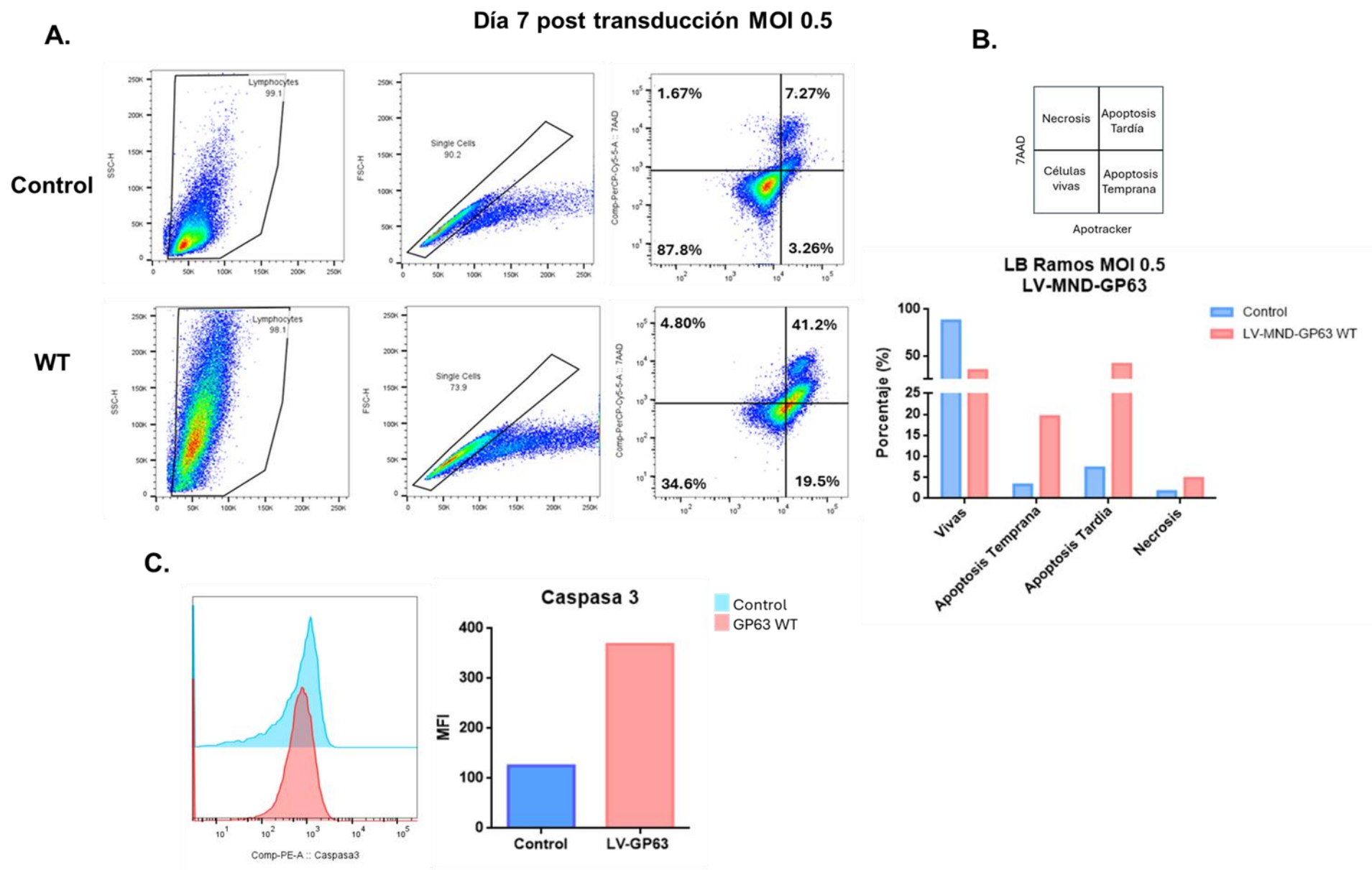
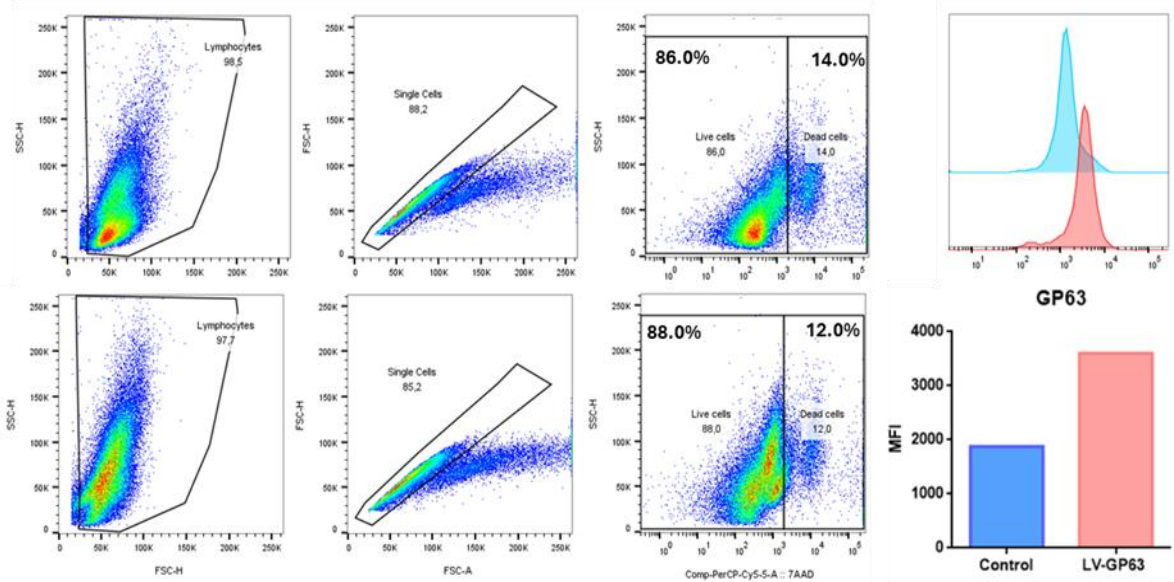


Figura 37 Muerte celular por apoptosis de los LB Ramos transducidos con LV-MND-GP63 WT. Clasificación de tipo de muerte celular de los LB al día 7 post transducción. **Ay B)** Dotplots de las poblaciones. Tinción con 7AAD y Apotracker™ para cuantificar los porcentajes de cada población de LB transducidos y en muerte celular. **C)** Histogramas y cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) para la Caspasa 3.

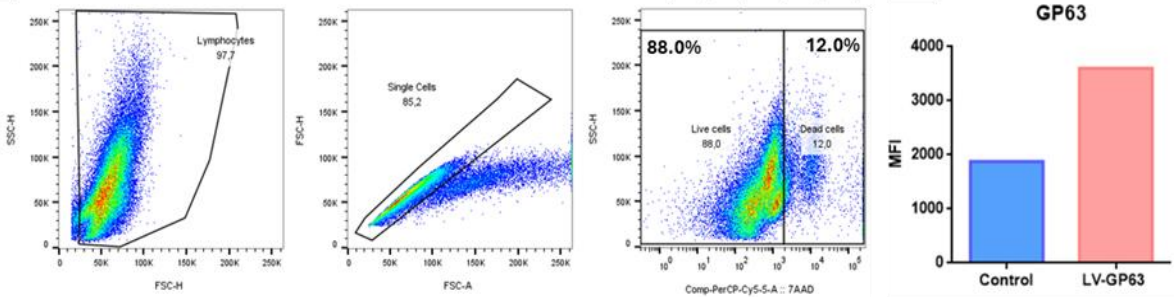
A.

Día 3 post transducción MOI 0.5

Control



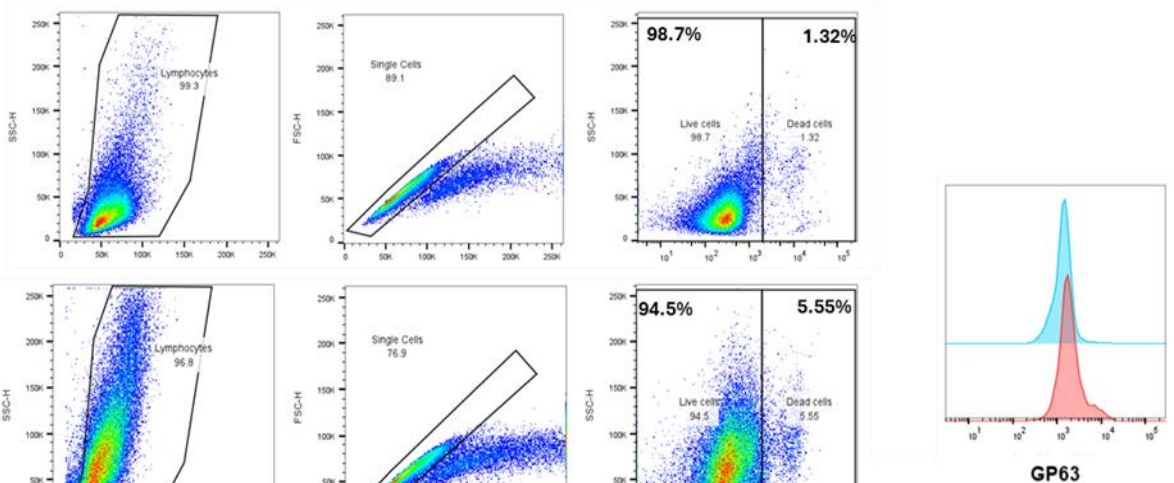
WT(1)



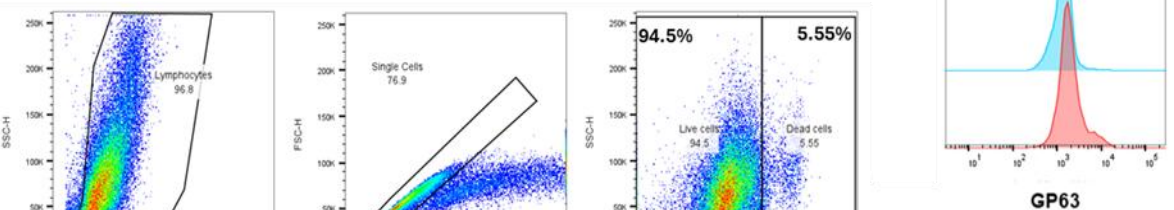
B.

Día 4 post transducción MOI 0.5

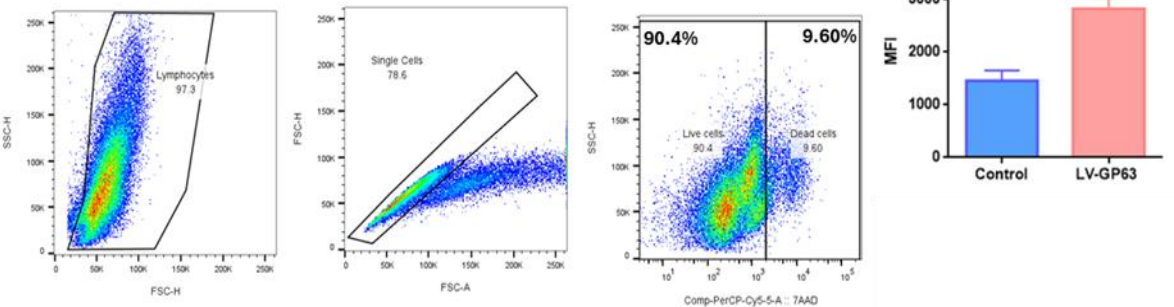
Control



WT(2)



WT(1)



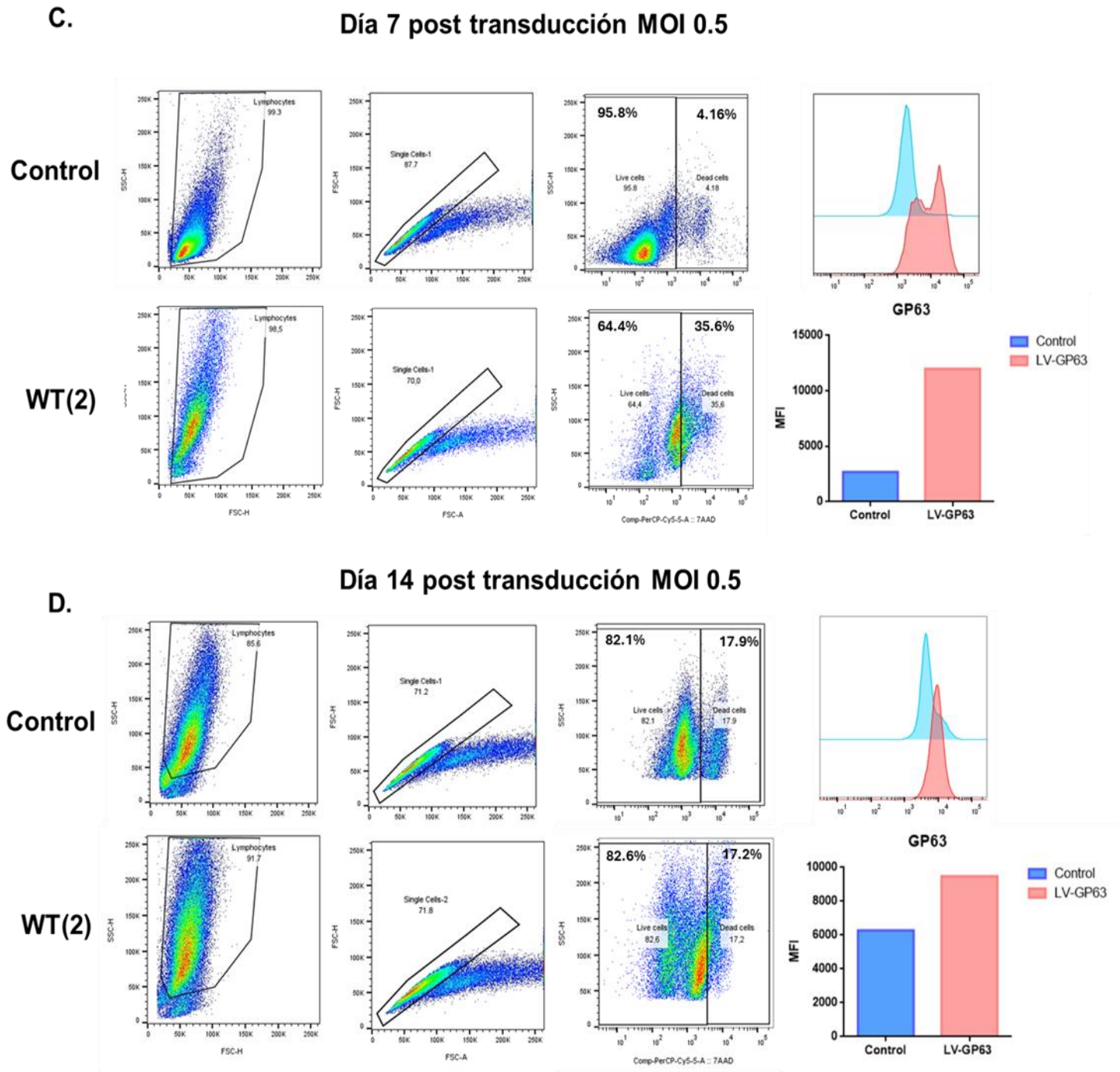


Figura 38 Cuantificación de la expresión intracelular de GP63 en Linfocitos B Ramos transducidos con el LV-MND-GP63 WT.

Los datos corresponden al seguimiento de expresión de GP63 intracelular en LB transducidos los días 3, 4, 7, y 14. Citometría de flujo intracelular con determinación de MFI de GP63 con anticuerpo anti-GP63. **A y B)** Dotplots de las poblaciones, sobrevida de los LB e histograma de cuantificación de la MFI de GP63 al día 3 y 4 post transducción. El día 4 observamos dos réplicas identificadas como **WT1 y WT2**. Se continúa el seguimiento únicamente para WT2 por pérdida de la viabilidad celular de la réplica WT1 al día 5 post transducción. **C y D)** Dotplots de las poblaciones, sobrevida de los LB e histograma de cuantificación de la MFI de GP63 al día 7 y 14 post transducción.

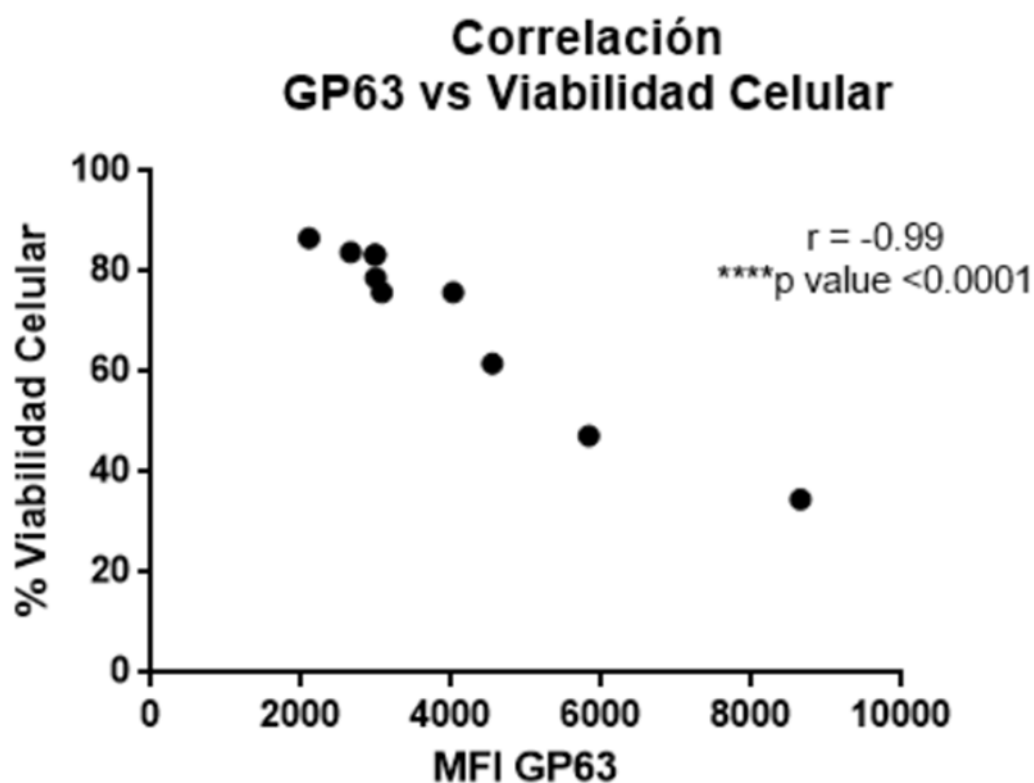


Figura 39 Análisis de correlación con asociación negativa entre la expresión de GP63 y la viabilidad celular de LB Ramos transducidos.

La gráfica representa el análisis de correlación para datos no paramétricos tipo Spearman entre la intensidad media de fluorescencia (MFI) de GP63 (eje x) y el porcentaje de viabilidad (7AAD) de los LB Ramos transducidos con LV-MND-GP63 (eje y) en los días 3,4,5,7 y 14. Observando una correlación negativa ($r=-0.99$) significativa con un valor de $****p < 0.0001$, indicando que a mayor expresión intracelular de GP63, menor viabilidad celular.

7.3.3.2 Expresión de marcadores de superficie en los LB Ramos transducidos con LV-MND-GP63: Inducción atípica de CD11b.

Se evaluó la expresión de marcadores de superficie en los LB Ramos transducidos a un MOI de 0.5. El marcador relacionado con linaje (CD19) a los días 3 y 7 post transducción, mostró valores de MFI inferiores al control sin estímulo y al control de transducción (Figura 40-41). Esta disminución podría deberse a la modulación de GP63 sobre vías de señalización intracelular relacionadas con la transcripción o el procesamiento de este receptor, previo a su expresión en la membrana.

La activación de CD38 y CD40 mostró que CD38 se mantuvo por debajo del nivel del control, siendo consistente con la medición anterior a diferentes MOIs. Por otro lado, el CD40 al día 7 tuvo un aumento que sugiere una activación tardía en los LB; fenómeno asociado de igual forma a la modulación intracelular realizada por GP63 (Figura 40-41). En cuanto a la presentación antigénica (HLA-DR) no se presentaron cambios significativos en comparación con los controles tanto al día 3 como al 7 post transducción. En contraste, se observó una subpoblación de LB (20.7%) con aumento de CD11b al día 3, comparado con el control sin estímulo (0.42%). Al día 7 se observa que disminuye el valor a un 4.0%, pero sigue siendo mayor al control sin estímulo (0.65%).

Este hallazgo sugiere que la expresión endógena de GP63 podría promover un perfil de activación aberrante, inflamatorio o una reprogramación funcional de los LB, reflejado por la inducción de CD11b y disminución de CD19 tras la transducción con LV-MND-GP63. Al reunir estos datos de CD11b a un MOI de 0.5, con todos los datos de expresión de CD11b obtenidos durante los experimentos anteriores con MOI de 1, 2 y 5, para el día 7 encontramos un efecto dosis (MOI) dependiente en la expresión de esta molécula, a mayor concentración del virus, mayor expresión de CD11b (Figura 42). Esta elevación de CD11b resulta muy llamativa, dado que este marcador no es típicamente expresado en LB y podría indicar un cambio en el estado funcional o fenotípico, inducido por la presencia intracelular de GP63.

LB Ramos Día 7 post transducción MOI 0.5

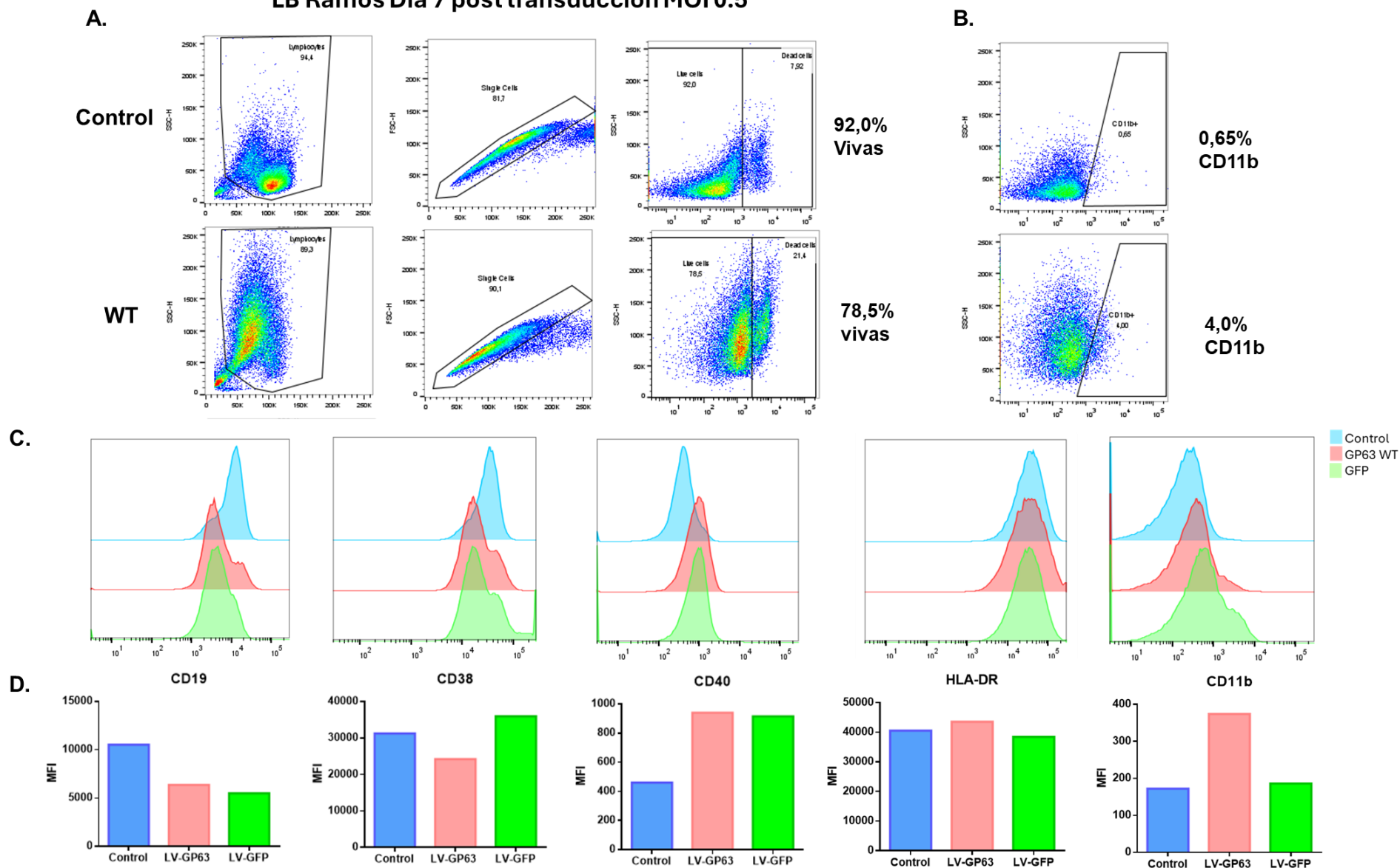


Figura 41 Expresión día 7 de marcadores de superficie CD19, CD38, CD40, HLA-DR y CD11b en LB Ramos transducidos a un MOI de 0.5. **A)** Dotplots de las poblaciones y viabilidad celular (7AAD) **B)** Porcentaje de CD11b. **C y D)** Histograma y cuantificación del MFI de cada uno de los marcadores.

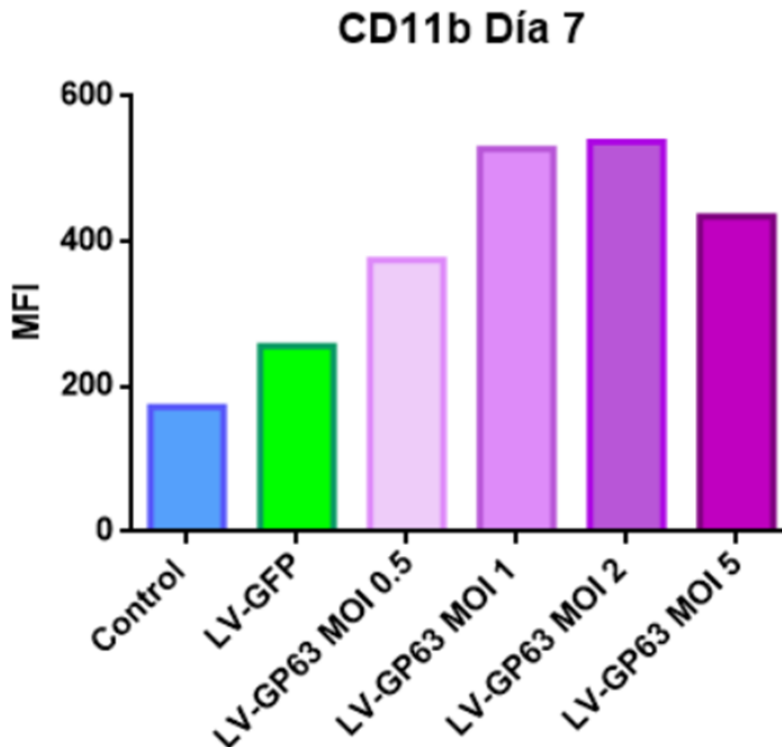


Figura 42 Expresión de CD11b MOI dependiente por modulación intracelular de GP63.

La imagen representa los datos de intensidad media de fluorescencia (MFI) de CD11b para el día 7 post transducción con LV-MND-GP63, a diferentes MOI de 0.5, 1, 2, y 5. Se observa una relación directa en el aumento de CD11b por efecto de la dosificación del lentivirus. Se representa en azul el control sin estímulo, en verde el control de transducción (GFP) y en violeta (diferentes tonalidades representando la intensidad de la dosis) del lentivirus.

7.3.3.3 La expresión intracelular de GP63 en los LB Ramos altera su identidad y condiciona su capacidad frente a señales inmunes.

Se evaluó la modulación fenotípica de marcadores linfocitarios en linfocitos B Ramos transducidos con el vector lentiviral LV-MND-GP63 y sus respectivos controles, tras la estimulación con distintos ligandos activadores (LPS, PMA y CpG).

La respuesta fue analizada mediante los cambios en la intensidad media de fluorescencia (MFI) de los marcadores CD19, CD38, CD27, CD45 y CD11b, con el objetivo de determinar si la presencia intracelular de la proteasa GP63 alteraba la capacidad de activación celular. Los linfocitos B GP63⁺ presentaron un perfil fenotípico diferencial, caracterizado por una baja recuperación de CD19, ya que ninguno de los estímulos utilizados logró aumentar su MFI a niveles comparables al control. Este hallazgo respalda la hipótesis de que GP63 inhibe la expresión de CD19 a nivel transcripcional, lo que podría reflejar una alteración del linaje B (Figura 43A).

Asimismo, se observó una escasa modulación de CD38 y CD45, cuyos niveles de expresión se mantuvieron estables frente a los estímulos aplicados. En particular, CD38 no presentó cambios significativos, ni por la expresión de GP63 ni por los estímulos activadores, lo que sugiere que no constituye un blanco funcional relevante en este contexto. Por su parte, la estabilidad en la expresión de CD45 sugiere integridad de membrana celular y descarta artefactos técnicos o errores de tinción (Figuras 43 C-D). Por último, se detectó una reducción aproximada del 50% en la MFI de CD27 en los linfocitos B GP63⁺ comparados con el control sin estímulo, lo que podría indicar una inhibición de los procesos de maduración celular o una interferencia directa en las señales de activación (Figura 43 B).

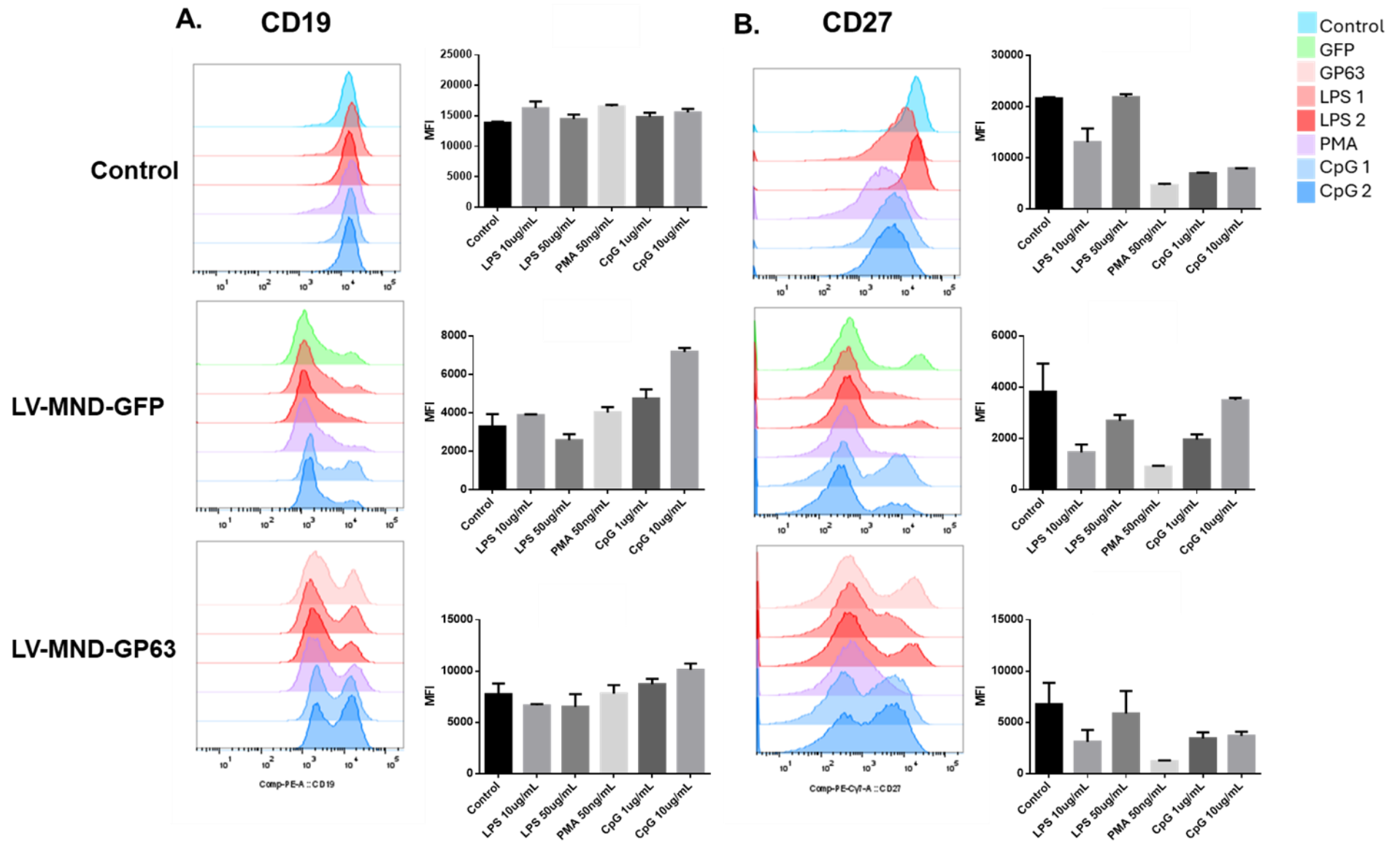
Finalmente, se observó que la expresión de CD11b se mantuvo elevada en los linfocitos B GP63⁺, alcanzando niveles comparables a los inducidos por el estímulo con PMA (vía activación de PKC). De manera similar, la estimulación con LPS también logró mantener la expresión de CD11b en niveles equivalentes, lo que sugiere una activación sostenida de esta molécula en presencia de GP63. Por otra parte, la vía CpG (TLR 9) se mantuvo inhibida en los LB transducidos, así que estímulos a través de la vía TLR9 tal vez no sea la que induce el CD11b en estos LB (Figura 43 E). Estos datos podrían indicar la presencia de un fenotipo no convencional en LB, de tipo regulador, sobre activado o anérgico. Es importante resaltar la temporalidad del experimento, ya que estas células congeladas al día 2

de transducción y luego procesadas en estos ensayos funcionales, tendrían aproximadamente día 3 o 4 post transducción y muchos de estos marcadores tienen a cambiar entre el día 5 y 7. Aun así, estos resultados sugieren que la presencia intracelular de GP63 altera la capacidad de respuesta fenotípica de los LB frente a los activadores clásicos.

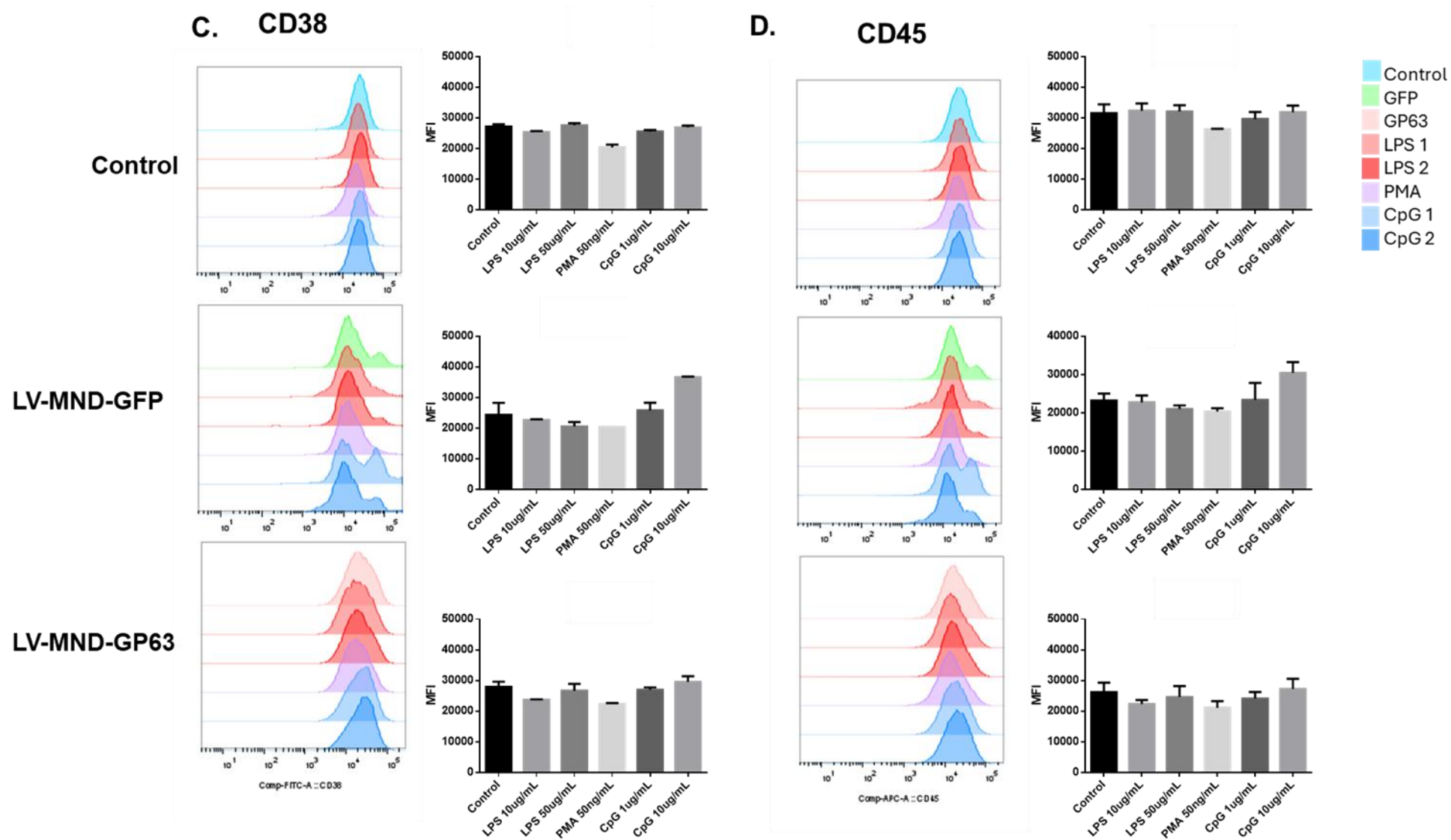
7.3.3.4 La secreción de IgM soluble y de TNF por los LB Ramos Gp63+ esta inhibida y no es restaurada bajo estímulo de activación clásica

En los ensayos de activación en los LB Ramos transducidos se presentó una secreción notablemente reducida de IgM al sobrenadante, la cual no fue restaurada por ninguno de los estímulos activadores empleados, incluyendo LPS, PMA o CpG. Este efecto se comparó con el control sin estímulo, que obtuvo en promedio una concentración basal de 738ng/mL a diferencia de las otras condiciones que no superaron los 400ng/mL aproximadamente; lo que sugiere una inhibición robusta del programa secretor de inmunoglobulinas inducida por GP63 (Figura A 44). Por otro lado, la producción de la citoquina TNF también se encontró disminuida en las células transducidas con GP63; con un valor nulo de detección comparado con el control sin estímulo que fue 12.6pg/mL. Sin embargo, este fenotipo fue parcialmente revertido con la estimulación con las dos dosis de LPS (8.01pg/mL y 9.6pg/mL) y con las de CpG (8.3pg/mL y 12.2pg/mL). Cabe resaltar, que en las células transducidas con un vector control codificante para GFP, no se observó inhibición en la producción de esta citoquina con un valor de 14.5pg/mL, lo que indica que los efectos observados son específicos de la expresión de GP63 (Figura 44 B).

LB Ramos activados durante 24 h



LB Ramos activados durante 24 h



LB Ramos activados durante 24 h

E. CD11b

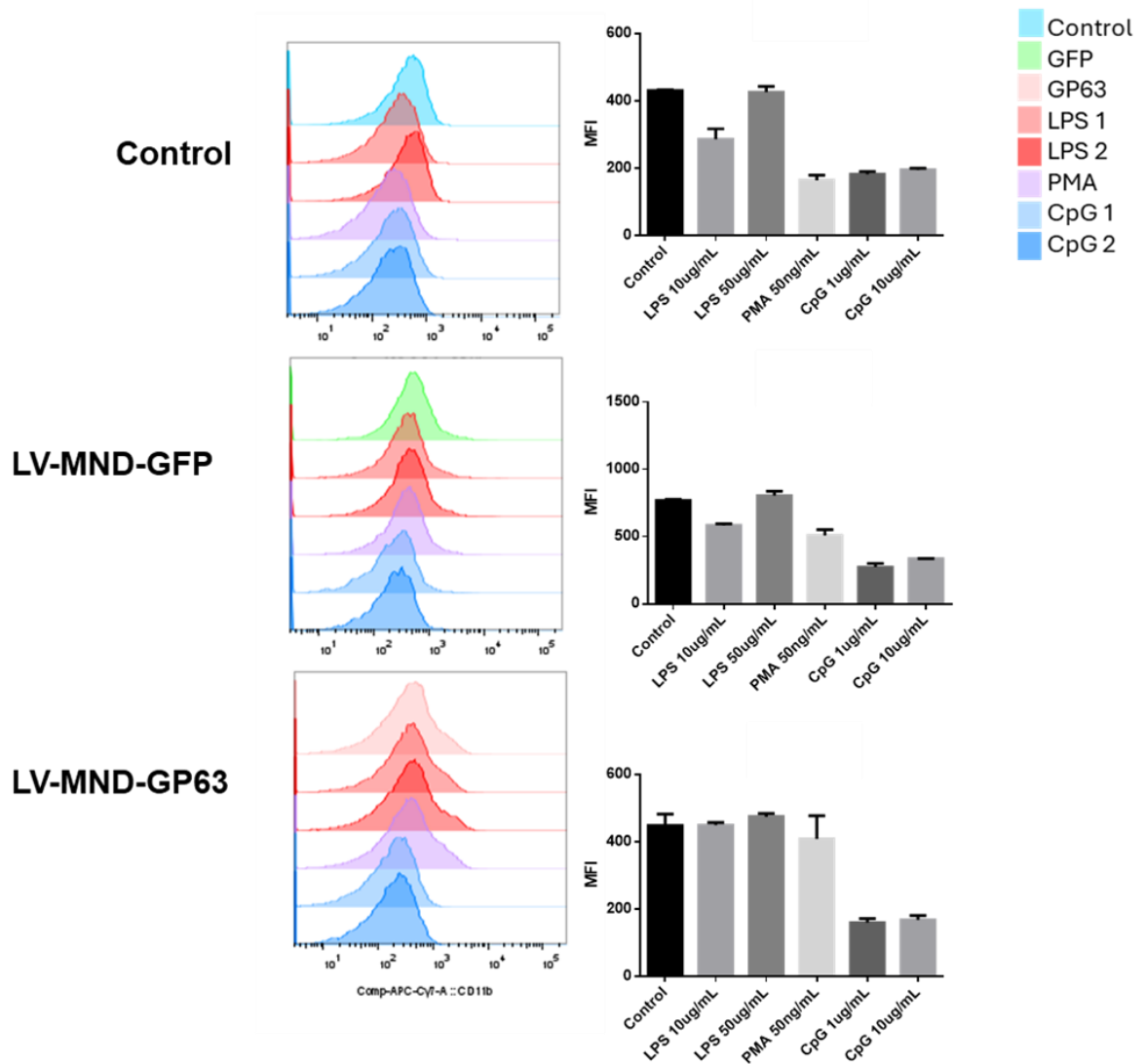


Figura 43 GP63 promueve un fenotipo no convencional en los LB Ramos que se caracteriza por resistencia a la activación clásica.

La imagen representa los histogramas y la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de **A)** CD19, **B)** CD27, **C)** CD38, **D)** CD45 y **E)** CD11b en LB Ramos, siendo control sin estímulo (azul claro), transducidos con LV-EF1a-GFP (verde) y transducidos con LV-MND-GP63 (rosado). Se activaron por 24h con las dosis: 10 y 50 µg/mL de LPS (rojo), 50ng/mL de PMA (morado), 1 y 10µg/mL de CpG (azul oscuro). Los datos corresponden a dos réplicas biológicas (n=2).

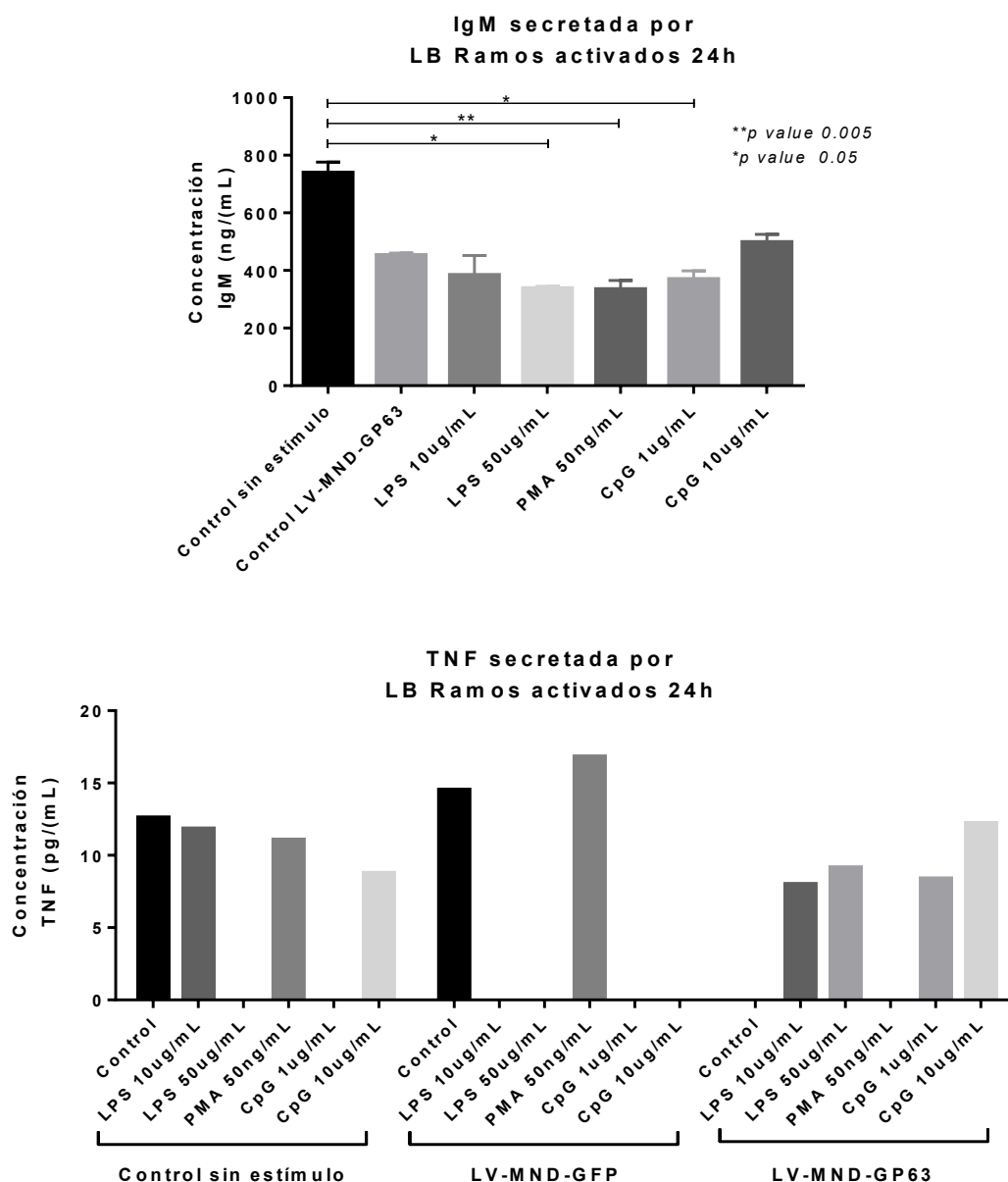


Figura 44 La proteína GP63 inhibe la secreción de IgM y la producción de TNF por LB Ramos transducidos sin restauración con la activación clásica.

Ensayo inmuno enzimático (ELISA) para detección de **A)** Concentración de IgM soluble / secretada al sobrenadante de los cultivos de LB Ramos. Se representa un control sin estímulo, un control transducido con LV-MND-GP63 sin activación y LB transducidos / activados. **B)** Concentración TNF secretada al sobrenadante de cultivos de LB Ramos sin transducción, un control transducido con LV-EF1a-GFP (MOI 10) y una condición de LB transducidos con LV-MND-GP63 a (MOI 0.5). En ambos casos durante 24h se expusieron a las dosis: 10 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de LPS, 50ng/mL de PMA, 1 y 10 $\mu\text{g/mL}$ de CpG. Los datos corresponden a dos réplicas biológicas (n=2). Los espacios en blanco/sin barras, corresponden a mediciones no cuantificables o por fuera de la linealidad de la prueba según el fabricante. La prueba estadística realizada fue Kruskal-Wallis test con indican un valor de significancia ****p 0.005** y ***p 0.05**.

7.3.3.5 Los MNSP transducidos con LV-MND-GP63 presentan una alteración en la distribución de subpoblaciones celulares sin afectar drásticamente la viabilidad celular

En un modelo de mayor complejidad celular, como lo son las MNSP transducidas con un MOI de 0.5, se realizó un seguimiento temporal entre las 24 y 120 horas post transducción. Aunque se observó una disminución progresiva en la viabilidad celular, esta fue menos pronunciada en comparación con la registrada en la línea celular Ramos. Sin embargo, se evidenciaron cambios relevantes en la distribución de las subpoblaciones celulares.

Las células GP63⁺ mostraron un aumento sostenido en la proporción de células CD3⁺ (Figura 45), acompañado por una disminución significativa en la frecuencia de linfocitos B CD19⁺, así como de la fracción CD3⁻CD19⁻, que presumiblemente incluye monocitos y células NK. Dentro de la población de linfocitos T CD3⁺, se observó una tendencia al aumento leve y progresivo de los linfocitos T CD4⁺, mientras que la frecuencia de linfocitos T CD8⁺ permaneció relativamente constante a lo largo del tiempo.

Estos cambios fenotípicos no se observaron en las células transducidas con el control lentiviral GFP⁺ (Figura 46), lo que sugiere que la expresión intracelular de la proteasa GP63 podría inducir alteraciones específicas en la composición celular de MNSP humanas.

7.3.3.6 Producción de TNF por los MNSP transducidos con LV-MND-GP63

En el modelo de MNSP transducidos, se observó una producción elevada y sostenida de TNF con niveles cercanos a los 30pg/mL, detectados desde las 24 horas post transducción. Este perfil inflamatorio no fue replicado por el control que expresa GFP, donde los niveles de TNF se mantuvieron bajos (menos de 10pg/mL) por el mismo periodo de tiempo (Figura 47). Este hallazgo contrasta con los resultados obtenidos en línea celular de LB Ramos, en la cual la expresión de GP63

intracelular se asoció con una inhibición significativa de la producción de la citoquina, incluso tras estimulación con agonistas como LPS o CpG. Estas diferencias sugieren que la producción de TNF inducida por GP63 en MNSP no depende exclusivamente de los linfocitos B, sino que puede involucrar otras subpoblaciones como monocitos, células NK o linfocitos T. Además, es posible que la interacción celular (contacto célula-célula o señales paracrinias) potencien la respuesta inflamatoria, colectiva, fenómeno ausente en el sistema de la línea celular pura. En conjunto estos datos destacan la importancia del microambiente inmunológico en la modulación de la respuesta inducida por GP63.

MNSP transducidos con LV-MND-GP63 (MOI 0.5)

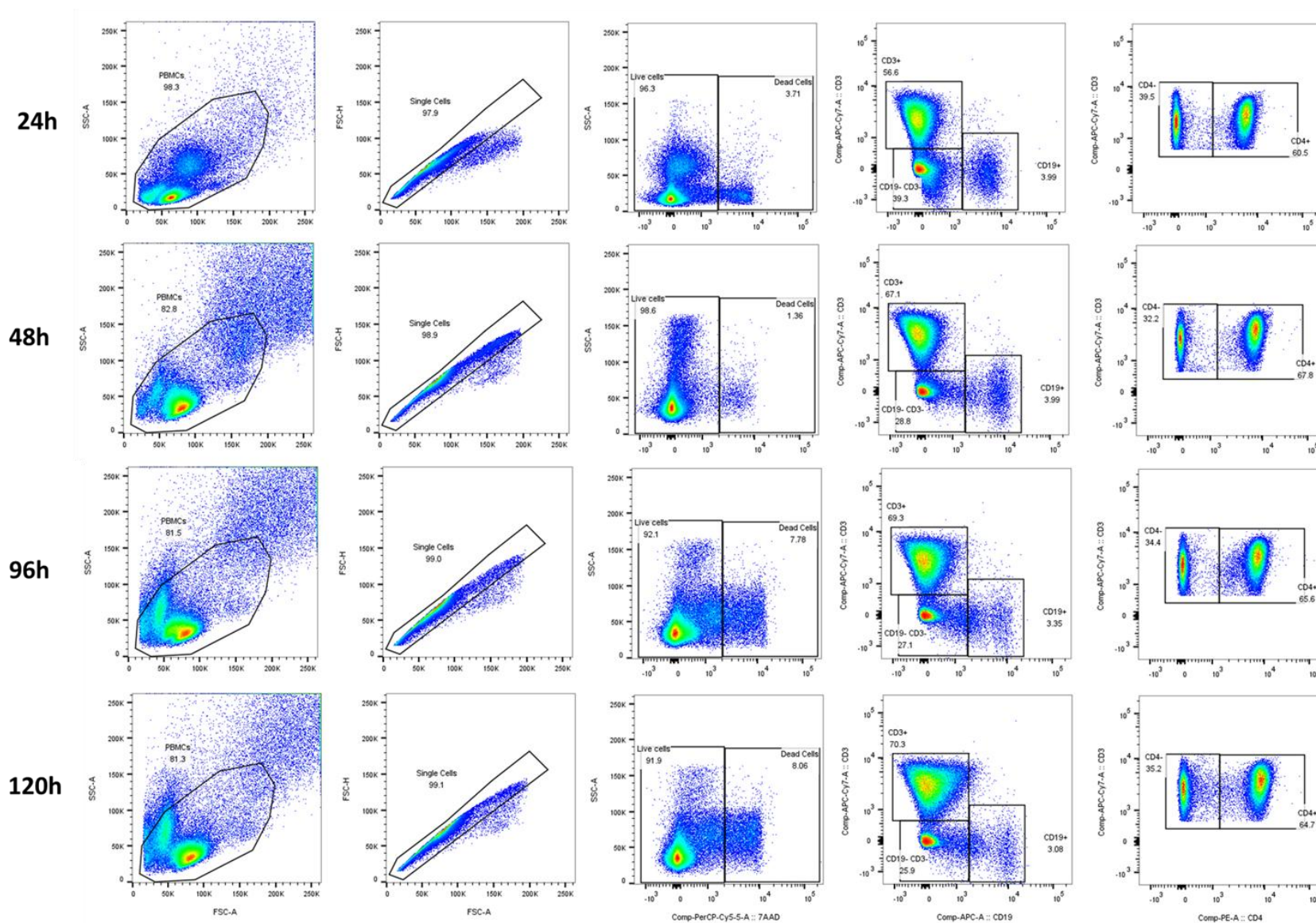


Figura 45 GP63 altera la distribución de subpoblaciones en MNSP. La imagen representa los Dotplots de la citometría de flujo de MNSP transducidos con LV-MND-GP63. Representa la supervivencia celular con (7AAD), población CD3+, CD19+, CD19-CD3-, CD4+ Y CD4- .

MNSP transducidos con LV-MND-GFP (MOI 10)

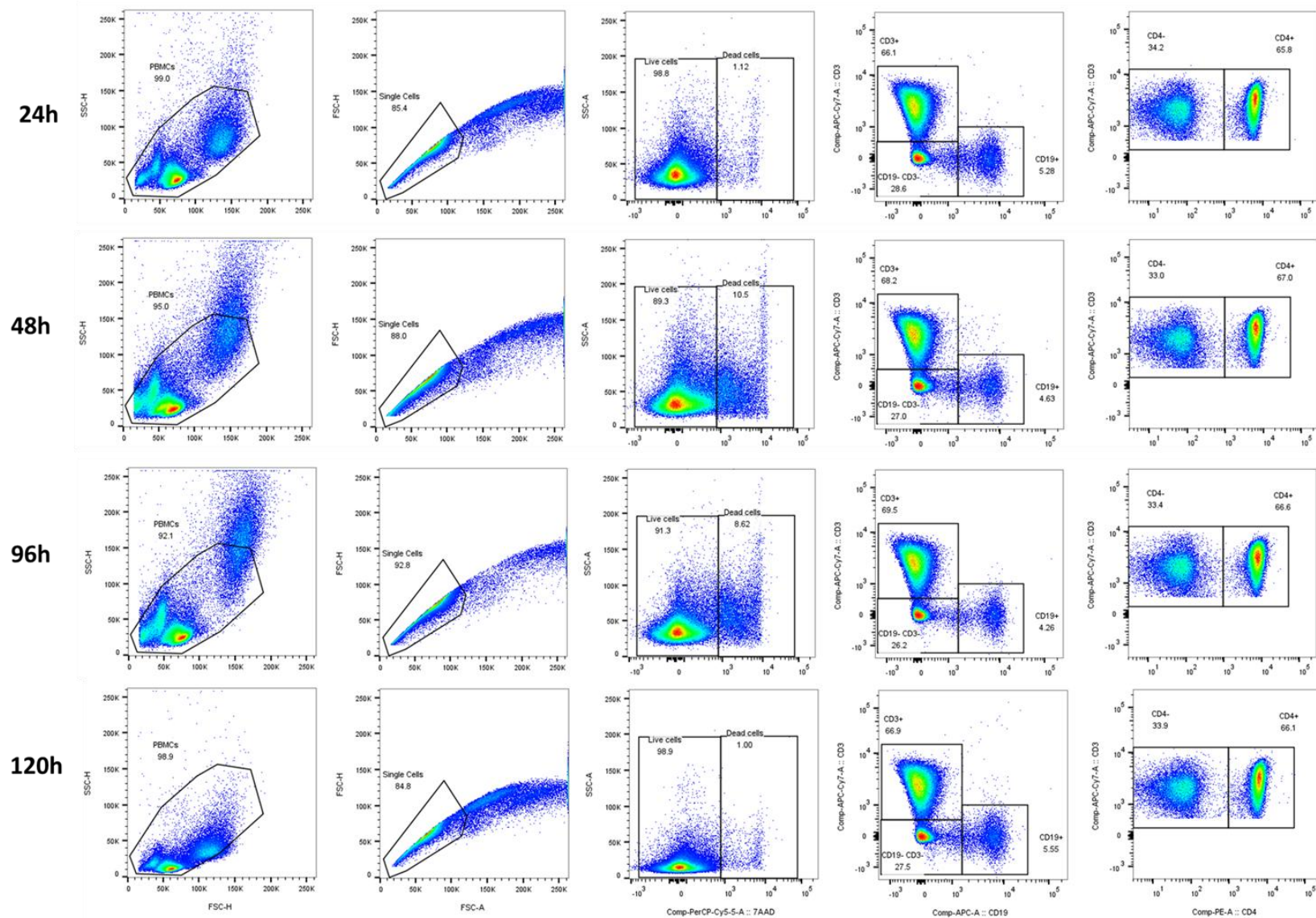


Figura 46 Los MNSP transducidos con LV-EF1a-GFP no presentan alteraciones en la distribución de subpoblaciones ni en la viabilidad celular. La imagen representa los Dotplots de la citometría de flujo de MNSP transducidos. Se observa la supervivencia (7AAD), población CD3+, CD19+, CD19-CD3-, CD4+ Y CD4-.

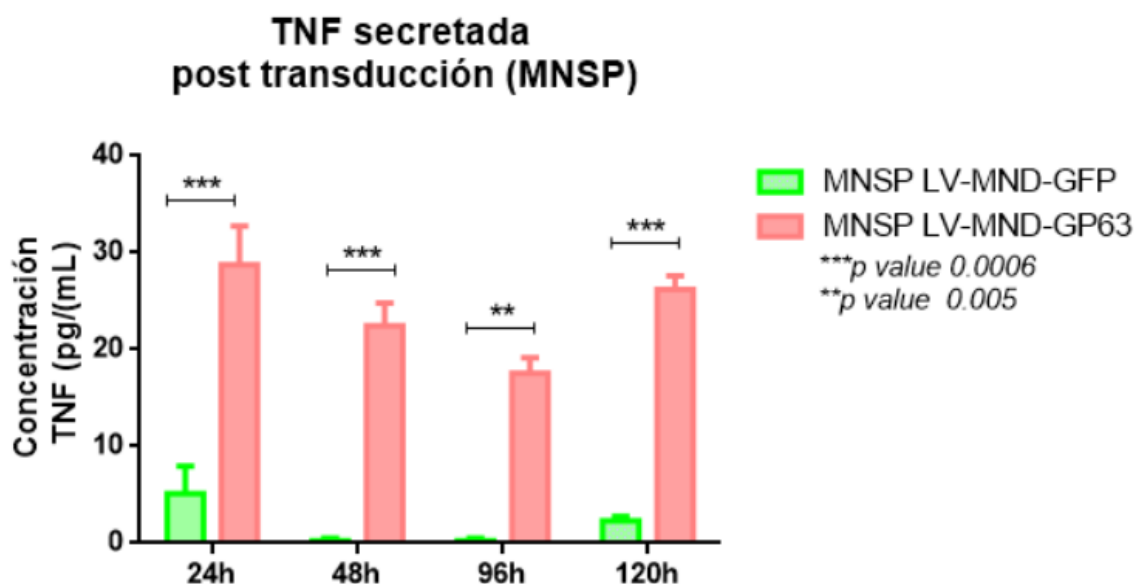


Figura 47 MNSP de donantes sanos transducidos con LV-MND-GP63 presentan producción sostenida de TNF a diferencia de los transducidos con LV-EF1a-GFP.

Ensayo inmuno enzimático (ELISA) para detección de la concentración en pg/mL de TNF en el sobrenadante de cultivos de MNSP comparando un control de transducción LV-EF1a-GFP (MOI 10) y MNSP transducidos con LV-MND-GP63 a (MOI 0.5). El seguimiento se realizó por 24, 48, 96, y 120 horas post transducción. Los datos corresponden a 3 réplicas biológicas (donantes sanos) (n=3). La prueba estadística realizada es ANOVA de dos vías y sus comparaciones múltiples (test de Tukey). Los asteriscos indican un valor de significancia **p0.005 y ***p 0.0006.

7.3.3.7 Expresión de CD38 y HLA-DR en MNSP transducidos no presenta diferencias.

En el modelo de MNSP humanos transducidos con el vector lentiviral LV-MND-GP63, se evaluó la expresión de los marcadores de activación CD38 y HLA-DR en distintas subpoblaciones celulares a lo largo del tiempo (24, 48, 96 y 120 horas), y se compararon con células transducidas con el vector control que expresa GFP. En cuanto a CD38, no se observaron diferencias significativas en las poblaciones de linfocitos B CD19⁺, ni en linfocitos T CD4⁺ o LT CD8⁺. Sin embargo, en la fracción CD3⁻CD19⁻ (que incluye monocitos y células NK), se evidenció una tendencia

decreciente en la expresión de CD38, con el tiempo, en presencia de GP63. En contraste, las células transducidas con el vector GFP⁺ no mostraron cambios detectables en la expresión de CD38 en ninguna de las subpoblaciones analizadas (Figura 48).

En relación con HLA-DR, los linfocitos B CD19⁺ no mostraron variaciones relevantes. Por su parte, los linfocitos T CD4⁺ y LT CD8⁺ presentaron una tendencia al aumento progresivo en la expresión de HLA-DR tanto en las condiciones GP63⁺ como GFP⁺, lo que sugiere una activación basal inducida por el proceso de transducción *per se*. De forma destacable, la fracción de monocitos y células NK transducidas con GP63 mostró una disminución progresiva en la expresión de HLA-DR a lo largo del tiempo, en coherencia con la capacidad previamente descrita de GP63 para modular funciones en células del linaje mieloide. Esta disminución no se observó en las células GFP⁺, lo que refuerza la especificidad del efecto atribuible a la proteasa GP63 (Figura 49).

En conjunto, estos resultados sugieren que GP63 puede inducir una reprogramación parcial de los marcadores de activación en MNSP humanas, con efectos diferenciados según la subpoblación celular analizada.

MNSP transducidos con LV-MND-GP63 (MOI 0.5)

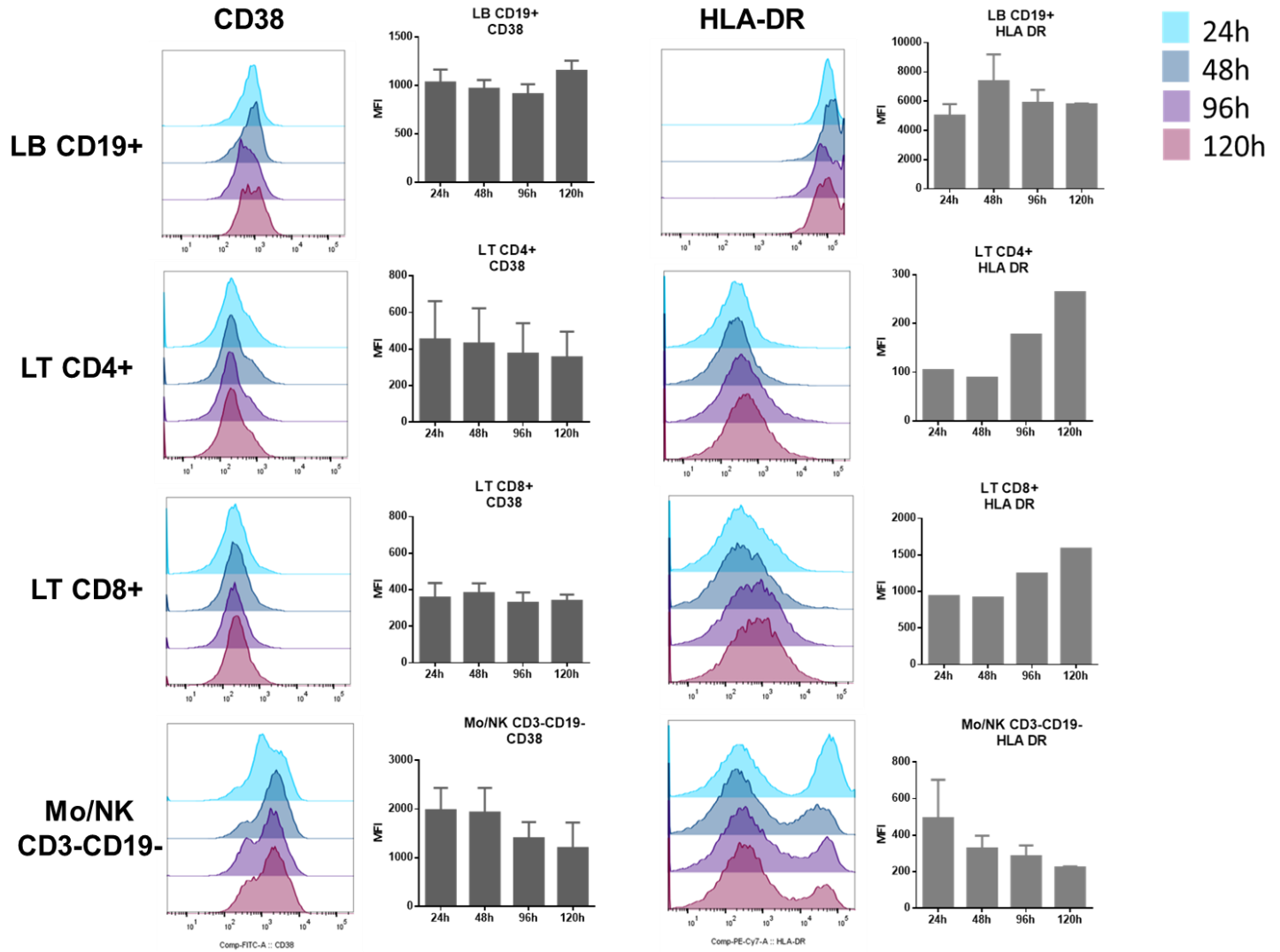


Figura 48 Modulación diferencial de CD38 y HLA-DR en subpoblaciones celulares de MNSP transducidos con LV-MND-GP63.

Se representan los histogramas y la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de CD38 y HLA-DR en MNSP transducidos que expresan GP63 intracelular, esta medición se clasificó por subpoblación celular LB CD19+, LT CD4+ y CD8+, Monocitos y células NK en la fracción CD3-CD19-. Esta evaluación se realizó por 24, 48, 96, y 120h. Los datos corresponden a tres réplicas biológicas de donantes sanos (n=3).

MNSP transducidos con LV-MND-GFP (MOI 10)

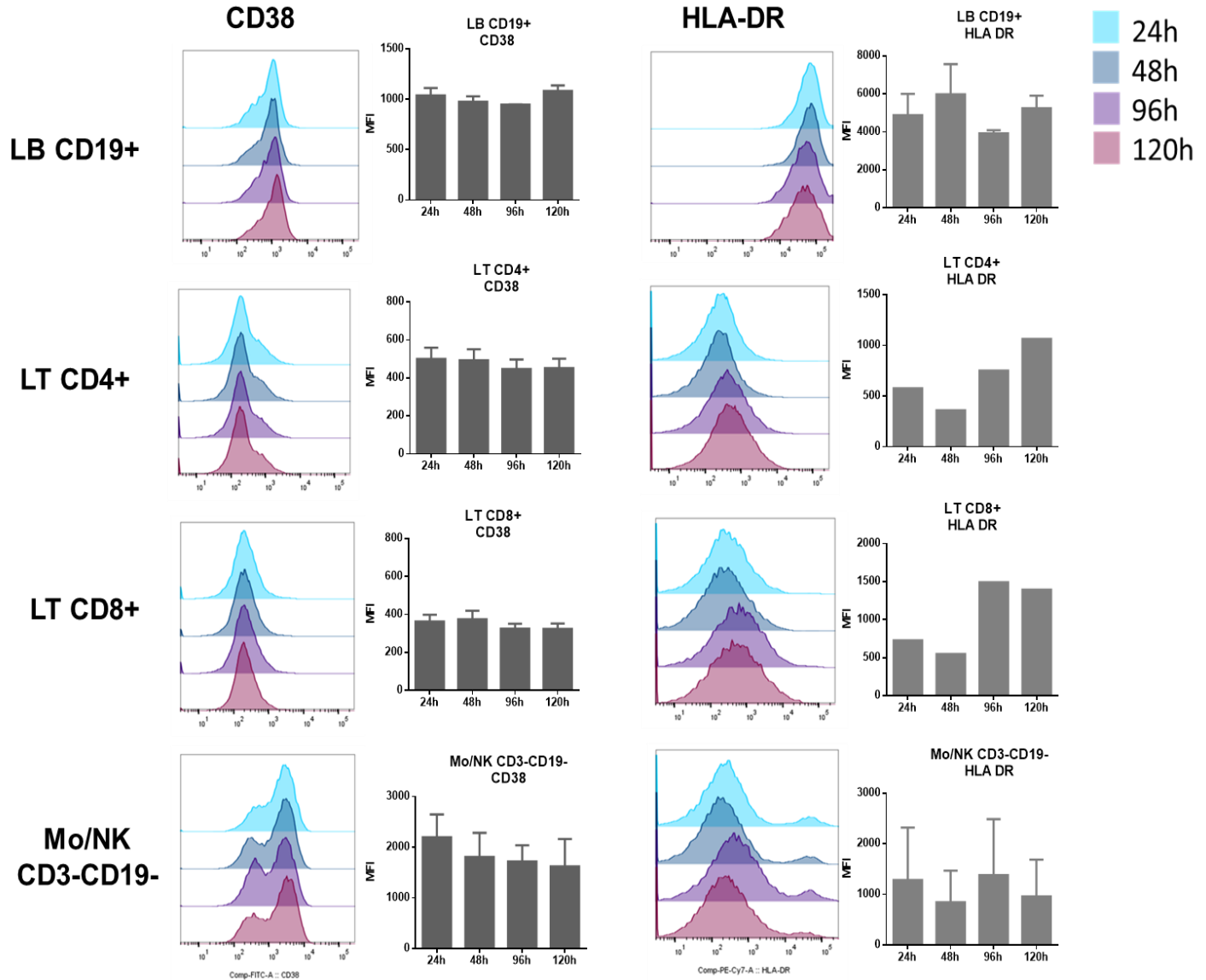


Figura 49 GFP no induce una reprogramación de marcadores de activación inmune en MNSP.

Se representan los histogramas y la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de CD38 y HLA-DR en MNSP transducidos con LV-EF1a-GFP, esta medición se clasificó por subpoblación celular LB CD19+, LT CD4+ y CD8+, Monocitos y células NK en la fracción CD3-CD19-. Esta evaluación se realizó por 24, 48, 96, y 120h. Los datos corresponden a tres réplicas biológicas de donantes sanos (n=3).

7.4 DISCUSIÓN CAPÍTULO 3

En este trabajo se utilizó la línea celular Ramos como modelo derivado de un linfoma de Burkitt humano, establecido a partir de células B malignas que retienen muchas características funcionales y fenotípicas de los LB maduros (185). Esta línea expresa marcadores típicos del linaje B como CD19, CD20, CD22 y CD38, y mantiene un receptor (BCR) funcional, lo que la convierte en un sistema útil para estudiar eventos asociados a la señalización del BCR, activación, proliferación y diferenciación de los LB. Su estabilidad, facilidad de cultivo y transducibilidad, la hacen adecuada para ensayos con vectores lentivirales y exposición a proteínas recombinantes (186) , como en el presente estudio. En este contexto, la línea Ramos fue seleccionada como modelo experimental para explorar el efecto de la proteasa GP63 sobre LB, bajo condiciones controladas y reproducibles que simularon mecanismos fisiopatológicos relevantes.

El análisis de los efectos de GP63 sobre los LB de la línea celular Ramos y las células mononucleares de sangre periférica de pacientes sanos, dependió significativamente de la vía de exposición a la proteína (exógena vs. intracelular).

Es importante considerar que, en el contexto de la adición exógena de GP63, no se puede asumir de forma directa que la proteína haya sido internalizada por las células. Existe la posibilidad de que la proteasa ejerza su efecto a través de receptores de superficie, como los TLRs o el BCR, sin necesidad de ingresar a la célula (187,188). No obstante, también se ha descrito que GP63 puede internalizarse mediante receptores como CR3 (CD11b/CD18), receptores de manosa (CD206), integrinas $\beta 1$ que reconocen fibronectina, y receptores tipo lectina C (49,177,189,190). En este estudio, no se evaluó la evidencia directa de internalización de la proteína posterior a la exposición exógena, por lo que no es posible concluir si los efectos observados en ese contexto se deben a la internalización o exclusivamente a una señalización desde la superficie. Sin embargo, por los resultados inferimos que, con la adición de GP63, inicialmente hay

una inducción a través de los receptores y con el paso del tiempo (entre 1 a 3 horas) (41,42,191,192), al ser internalizada, interviene en la señalización intracelular.

La adición de GP63 recombinante, como la realizada en nuestro estudio, representa un enfoque experimental que imita de forma funcional la acción de los exosomas y el mecanismo complejo de comunicación celular; particularmente en lo relacionado con la dosificación localizada y sostenida de la proteasa sobre las células diana. Esta estrategia permite aislar el efecto específico de GP63, sin la interferencia de otros componentes vesiculares, y resalta su capacidad intrínseca para modular la respuesta inmune (193).

Por otra parte, con el lentivirus para la expresión intracelular de GP63, si se garantiza la presencia de la proteína en el ambiente citoplasmático, lo que permite una intervención más específica sobre rutas de señalización, citoesqueleto y mecanismos de muerte o proliferación celular (21,194). Estas alteraciones desde el interior complementan y fortalecen las observaciones obtenidas mediante la adición exógena de la proteína, sugiriendo que GP63 puede ejercer efectos tanto desde la superficie celular como a través de su acción intracelular directa.

Al analizar los efectos sobre la viabilidad y la proliferación celular, observamos de forma consistente que, tanto la exposición exógena como la expresión intracelular de la proteasa GP63 WT, disminuyen la viabilidad y la capacidad proliferativa de los LB Ramos. Esto ha sido reportado en otras células como las células asesinas naturales (NK) al entrar en contacto con parásitos de *Leishmania spp* (195). La reducción de la viabilidad con GP63 WT recombinante, fue significativa a una dosis de 20ng/mL, disminuyendo las células viables a 61% a las 48h, un efecto que se atribuye a la actividad catalítica de la proteína. Esta dosis de proteína es mucho más baja de lo reportado por otros grupos, donde han empleado dosis en el orden de magnitud de los microgramos ($\mu\text{g/ml}$) (42). Sin embargo, las exposiciones realizadas en esos estudios fueron de pocas horas entre 1 y 3 horas de tratamiento, mientras que nuestra dosis que, si bien es baja, estuvo por más tiempo en contacto

con las células (48h) y pudo ejercer su función por un periodo más prologado, igualando los efectos de una concentración mayor o incluso amplificarlos.

Del mismo modo, la expresión intracelular de GP63 WT en LB Ramos, indujo una disminución de la viabilidad celular de aproximadamente 30-40% a los 5 días post transducción, aumentando la mortalidad a medida que avanzaba el tiempo (47.3% de células viables al día 8 post transducción con MOI 5). En estudios como el de Antonia et al, no se indicaron concentraciones precisas de la proteína recombinante ni se evaluó la viabilidad celular tras exposición a GP63 (48,83) . Esta omisión impide establecer comparaciones y umbrales mínimos efectivos o márgenes de toxicidad, limitando la reproducibilidad cuantitativa.

La muerte celular inducida por GP63 WT intracelular se caracterizó principalmente por eventos apoptóticos, incluyendo apoptosis temprana y tardía, así como la activación de Caspasa 3, un marcador clave de apoptosis (182,184). Además, se observaron cambios morfológicos como agrupación celular, pérdida de integridad de membrana y fragmentación nuclear; mientras que con el plásmido que expresaba la proteína GFP no se evidenció muerte celular, lo que confirma que el efecto en la mortalidad de las células es debido a GP63 y no al sistema lentiviral.

La modulación de la viabilidad celular inducida por GP63 ha sido previamente estudiada en el contexto de la interacción entre parásitos de *Leishmania* spp. y las células del hospedero. En células mieloides, como los macrófagos, se ha observado que la presencia de GP63 promueve la supervivencia celular en lugar de inducir apoptosis (196). En contraste, Hallé et al. (2009) reportaron que linfocitos expuestos a fragmentos de membrana de *Leishmania major*, ricos en GP63, sufrían apoptosis asociada a una alteración en la expresión de caspasa-3 (41).

Adicionalmente, Cecilio et al. (2014) describieron una disminución en los niveles de Bcl-2 junto con un aumento en la expresión de BIM, un perfil característico de la activación de vías apoptóticas. De manera similar, Mukherjee et al. (2006) también

documentaron esta correlación en el contexto de la muerte celular programada mediada por GP63 (196,197).

Los hallazgos de este proyecto incluyeron mediciones exactas de dosis de GP63 y evaluaciones de viabilidad celular, lo cual fortalece la interpretación biológica y permite hacer afirmaciones más sólidas; en especial al recrear el comportamiento citotóxico de GP63 en un sistema libre del parásito, y de forma dirigida a una población celular no convencional como lo son los LB.

La inhibición de la proliferación también fue un hallazgo constante. La GP63 WT recombinante causó una disminución significativa del índice de proliferación y expansión de los LB Ramos. De manera similar, la expresión intracelular de GP63 WT resultó en una inhibición aparente de la capacidad proliferativa, observándose una disminución en la densidad celular y una ausencia de la expansión típica de los cultivos, lo cual fue dependiente de la dosis del lentivirus (MOI). La proteína mutante (mt) de GP63, en contraste, no mostró tener impacto en la viabilidad y proliferación cuando se hizo la exposición exógena, y no se pudo evaluar eficazmente en el contexto intracelular debido a una integración deficiente del lentivirus. La atribución de estos efectos sobre la proliferación celular directamente a la proteína GP63 y no al sistema lentiviral fue confirmada mediante el uso de un lentivirus control que expresaba GFP, el cual no afectó la proliferación celular.

La consistencia de los efectos observados sobre la proliferación sugiere la participación de rutas de señalización intracelular específicas, cuya alteración por GP63 podría explicar el fenotipo inhibitorio, particularmente aquellas asociadas a la activación del BCR y la regulación del ciclo celular en los LB, especialmente la inactivación de la vía de proteína quinasa C (PKC) y de la cascada de quinasas activadas por mitógenos (MAPK) por GP63, se ha asociado con inhibición de la proliferación celular (16,55,198). Esta vía de activación a través de la estimulación del BCR y de receptores coestimuladores, desencadena señales necesarias para la progresión del ciclo celular. A su vez, la activación de PKC puede inducir la

fosforilación de componentes de la vía MAPK, como ERK1/2, JNK y p38, promoviendo la expresión de factores de transcripción (por ejemplo, c-Myc, AP-1) que regulan genes implicados en la proliferación y diferenciación de los LB (41). Así, ambas vías están funcionalmente interconectadas y su activación coordinada resulta esencial para una respuesta proliferativa eficaz tras el reconocimiento antigénico (199).

Adicionalmente, se ha descrito que la estimulación de la vía de TLR9 es crucial para inducir la proliferación de LB en humanos, especialmente en contextos de activación (144,200). En nuestro estudio, la inhibición observada en la proliferación tras el tratamiento con GP63 sugiere que esta proteasa podría estar interfiriendo con la señalización mediada por TLR9 (201), ya sea bloqueando su activación o afectando componentes clave de su vía intracelular. Este planteamiento se refuerza con la observación de que, durante la estimulación con CpG (ligando específico de TLR9), los LB tratados con GP63 no mostraron una respuesta a la activación, lo que confirma que esta vía se encuentra funcionalmente inhibida, posiblemente como parte del mecanismo inmunomodulador ejercido por GP63(202,203).

Posterior al análisis de viabilidad y proliferación celular, evaluamos el estado de activación de los LB. Este proceso fundamental mediante el cual las células del sistema inmune responden a estímulos externos, como antígenos, citoquinas o señales del microambiente; que implica una serie de eventos coordinados que incluyen la reorganización del citoesqueleto, la transducción de señales intracelulares tras el compromiso del BCR o de receptores coestimuladores, y la modificación de la expresión de moléculas de superficie (94,97). Este proceso también se caracteriza por iniciar el ciclo celular, la proliferación, la diferenciación funcional y la producción de inmunoglobulinas (204–207). También, la secreción de citoquinas y quemoquinas que modulan el entorno y coordinan la respuesta inmune. La evaluación de estos cambios fenotípicos y funcionales constituye una herramienta esencial para interpretar el estado inmunológico de las células y su grado de compromiso con una respuesta efectora o reguladora.

Teniendo en cuenta este aspecto, se evaluó la modulación diferencial de los marcadores de superficie e intracitoplasmáticos por GP63, dependiendo de si la exposición fue exógena o la expresión intracelular. El comparar los efectos según la localización de GP63 permite discriminar entre mecanismos mediados por señales de superficie y aquellos dependientes de rutas intracelulares más profundas.

A pesar de la disminución de viabilidad, los LB expuestos a GP63 WT recombinante mostraron un aumento significativo en la expresión de CD38, un marcador asociado con activación, diferenciación plasmocitoide y regulación inmunológica (164,208). La exposición a GP63 WT (20ng/mL) indujo un aumento significativo en la expresión de CD38 en LB Ramos, duplicando el valor del control y sugiriendo una activación parcial o alternativa. Este efecto fue consistente en LB derivados de MNSP donde el aumento de CD38 fue progresivo y máximo a las 72h. En contraste, la expresión intracelular de GP63 WT no produjo un aumento de CD38; de hecho, los niveles de expresión se mantuvieron por debajo del control. Esta diferencia es crucial y sugiere que las vías de señalización activadas son distintas según la localización de la proteína.

Estos hallazgos sugieren una activación o una reprogramación fenotípica inducida por la proteasa. El CD38, además de ser un marcador de superficie ampliamente utilizado para caracterizar distintas etapas del desarrollo de los LB, y subpoblaciones funcionales como los LB reguladores (CD24^{hi} CD38^{hi}) y los plasmablastos, cumple funciones críticas como modulador de la señalización intracelular y del microambiente inmunológico (163,209,210). Su asociación con el complejo del BCR, especialmente con CD19, así como su participación en las vías de AKT y MAPK, lo posicionan como un regulador clave de la activación, proliferación y diferenciación de los LB (211–213). Adicionalmente, su actividad enzimática contribuye a la generación de adenosina, una molécula inmunosupresora que puede favorecer un entorno de tolerancia o evasión inmune (163,214,215). En este contexto, la inducción de CD38 por GP63 podría reflejar un

intento de reprogramación hacia un fenotipo regulador o anérgico, coherente con el efecto observado en la baja proliferación. Estos hallazgos plantean la posibilidad de que CD38 actúe como un intermediario funcional, en la respuesta de los LB frente a señales exógenas como GP63, con implicaciones tanto fisiopatológicas como terapéuticas.

Por otro lado, la expresión intracelular de GP63 WT mediante un sistema lentiviral resultó en la inducción significativa del marcador CD11b (MAC-1/CR3) en los LB de la línea celular Ramos, sugiriendo una reprogramación hacia un fenotipo regulador o activado asociado a funciones inmunomoduladoras (175).

Aunque el CD11b no se expresa en condiciones de reposo en LB convencionales, presentó una expresión sorprendentemente alta en los LB Ramos transducidos con GP63 WT intracelularmente. Este aumento de CD11b fue dependiente de la dosis de lentivirus (MOI) y sugiere un cambio funcional o fenotípico en los LB, indicando un posible perfil "no convencional" de tipo regulador, sobre activado o anérgico (216,217). Es importante destacar que la exposición exógena no mostró una inducción significativa de CD11b, ni siquiera en comparación con otros activadores.

Su inducción puede ser promovida por señales inflamatorias, activación por TLRs, o estímulos derivados de patógenos, escenarios en los que GP63 podría estar mimetizando ciertos efectos inmunológicos. El aumento de CD11b en LB se ha asociado con capacidades reguladoras, tales como la supresión de LT CD4+, la inhibición de la señalización del BCR, y la modulación de vías como NF- κ B y STAT3-HIF-1 α (217). Estas propiedades sugieren que la expresión de GP63 en los LB no solo altera su perfil de activación, sino que podría favorecer la adquisición de un fenotipo B-regulador (Breg) funcionalmente tolerogénico (9,146,218). Esta hipótesis cobra relevancia a la luz de reportes previos en los que el CD11b ha sido implicado en la regulación de respuestas inflamatorias en enfermedades autoinmunes y en la generación de tolerancia periférica (175,219–221). Así, la inducción de CD11b por GP63 intracelular no solo representa un marcador fenotípico de activación, sino que

también puede constituir una vía crítica, a través de la cual esta proteína ejerce efectos inmunomoduladores sobre los LB.

A diferencia de la expresión alta de los marcadores anteriormente mencionados, el CD19 no mostró alteraciones relevantes con la exposición exógena a la proteasa, pero sí presentó una leve disminución en condiciones de transducción lentiviral. Este hallazgo sugiere que la modulación ejercida por GP63 sobre la biología de los LB no se realiza a través de la activación directa del complejo del BCR, donde CD19 actúa como un correceptor clave, sino que probablemente implica vías independientes o incluso inhibidoras de la señalización clásica (162). La reducción de CD19 en el contexto de la expresión intracelular podría reflejar un mecanismo de retroalimentación negativa o de tolerancia inducida, como se ha descrito en LB expuestos a señales crónicas, inflamatorias o de estrés intracelular (222). Adicionalmente, se ha reportado que alteraciones en la expresión de CD19 afectan la organización de la sinapsis inmunológica y la intensidad de la señal a través del BCR; por lo tanto, su disminución podría estar relacionada con una reducción funcional de la activación convencional. Estos datos soportan la idea, de que la localización intracelular de GP63 es determinante para la reprogramación fenotípica observada, modulando de manera selectiva marcadores relacionados con diferenciación, activación reguladora e inmunomodulación, sin necesariamente activar el eje clásico del BCR/CD19.

Al mismo tiempo, la expresión de HLA-DR no mostró cambios significativos ni con la exposición a GP63 recombinante ni con su expresión intracelular. La evaluación de HLA-DR en LB constituye una herramienta clave para determinar su estado funcional y potencial de activación. Algunos estudios sugieren, que GP63 altera las balsas lipídicas en células mieloides como los macrófagos, afectando la presentación de antígenos (223,224). El HLA-DR, como molécula del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II), está involucrada en la presentación de antígenos a los LT CD4⁺, y su expresión se incrementa tras la activación celular (171,172). Su análisis tanto en condiciones de exposición exógena como de

expresión intracelular de GP63, fue relevante para determinar si GP63 podía inducir un fenotipo activado en los LB, potencialmente vinculado a funciones de presentación de antígeno, diferenciación o incluso reprogramación hacia subtipos con funciones reguladoras (146,225). Sin embargo, sus resultados no fueron lo suficientemente correlacionables con un estado en particular y no fue posible asociarlo directamente al fenotipo observado.

En el mismo contexto de evaluación de la activación celular, se había seleccionado Syk como molécula blanco teniendo en cuenta su papel central en la señalización intracelular. Syk es una tirosina quinasa esencial para la fosforilación de los motivos ITAM del complejo del BCR, y participa en procesos clave como la reorganización del citoesqueleto de actina, el tráfico vesicular, la presentación antigénica y la supervivencia celular. Algunos estudios han documentado su papel crítico en la integración de señales en los LB (226,227). Las predicciones *in silico* reportadas en el capítulo 1 de este trabajo, indicaban que GP63 podía interactuar directamente con Syk, lo que planteaba una hipótesis bioquímica sólida sobre su modulación funcional.

Sin embargo, de manera inesperada, Syk no mostró cambios significativos en su detección total, tanto con la exposición exógena a GP63 como con su expresión intracelular. Esto puede ocurrir ya que los resultados obtenidos mediante análisis *in silico* no siempre se replican de forma idéntica en experimentos *in vitro*, debido a las diferencias entre las condiciones simuladas y los sistemas biológicos reales (105,228). Es importante resaltar, que no evaluamos cambios en la fosforilación de Syk, por lo tanto, no podemos asegurar que no hubiese interacción que afectara su función, pero al menos en la detección total no se encontraron diferencias. En este sentido, la posibilidad de que GP63 interactúe con Syk no se descarta, y tal vez la activación atípica y déficit en la proliferación observada, pueda deberse a la capacidad de GP63 para modular esta vía, generando anergia en estas células. Este hallazgo sugiere que, al menos en el sistema experimental empleado, Syk no

representa un blanco directo de la actividad de GP63, o que su regulación pudiera requerir condiciones adicionales no reproducidas en este modelo.

A raíz de los resultados obtenidos con Syk, nos llevó a considerar otras posibles vías intracelulares de activación, como la vía cGAS–STING, bastante relevante en el contexto de transducción viral y mediación de respuestas inflamatorias frente a la detección del DNA citosólico (229).

La expresión intracelular de GP63 WT se asoció con niveles elevados de STING, de forma tiempo-dependiente. Esto sugiere que la presencia intracelular de GP63 generó un estado de estrés celular y muerte programada, que pudo liberar material genético que activó esta vía; resaltando que este comportamiento no se observó con el lentivirus control de expresión de GFP, lo que descarta al sistema lentiviral como inductor.

La vía cGAS–STING es un eje central en la activación de la inmunidad innata, particularmente en la detección de DNA citosólico proveniente de virus, bacterias, parásitos o incluso del propio huésped (230). En el contexto de vectores lentivirales, se ha demostrado que el DNA empaquetado en las preparaciones virales puede activar a las células a través de esta vía. Siendo cGAS la enzima responsable de detectar dicho DNA y activar STING, independiente de vías de receptores tipo TLRs o RIG-I, resultando en la producción de interferón y otras citoquinas proinflamatorias (174). Curiosamente, en nuestro caso no se evidenció aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF o IL-6, tras la transducción con el lentivirus codificante para GP63 WT ratificando, que lo observado no es atribuible al lentivirus *per se*, sino al efecto modulador de GP63 intracelular.

La exposición de LB de la línea Ramos a GP63, también se asoció con un ligero aumento en la expresión de CD40. En los ensayos donde se evaluó el impacto de la expresión intracelular de la proteína GP63 en LB Ramos, se observó que la expresión de CD40 mostró una leve superioridad en comparación con los controles al quinto día post transducción. Sin embargo, esta tendencia no se mantuvo, ya que

al séptimo día se registró una caída general en la expresión de esta molécula. Esto sugiere una aparente modulación temporal de CD40 por la GP63 intracelular.

Por otro lado, en la transducción posterior con un MOI más bajo (0.5), el CD40 mostró un aumento al día 7, lo que podría indicar una activación tardía, tal vez por ser una dosis inferior, le tomó más tiempo elevar este marcador en los LB.

La relevancia de CD40 en el contexto de moléculas asociadas a *Leishmania*, ha sido documentada en células dendríticas, donde la expresión de CD40, junto con otras proteínas coestimuladoras como CD86, actúan como un marcador de activación y respuesta de LT (138,142). Si bien en nuestro modelo las células evaluadas fueron LB y no en células dendríticas (CDs), la ligera elevación de CD40 podría reflejar un efecto indirecto en la inducción de la activación celular modulada por GP63.

El CD40 es un receptor expresado de forma constitutiva en LB desde la fase pre-B tardía hasta los LB de memoria. Su interacción con CD40L (CD154), expresado principalmente en LT activados, es fundamental para la activación completa de los LB, la proliferación, cambio de isotipo y la maduración de afinidad en los centros germinales (138). Esta señalización no solo promueve la diferenciación hacia células plasmáticas y de memoria, sino que también favorece la supervivencia celular mediante la inducción de moléculas anti apoptóticas. En conjunto, CD40 constituye un nodo esencial en la cooperación B -T y en la generación de respuestas de anticuerpos de alta afinidad (142). Es importante resaltar, que este marcador no fue evaluado en los ensayos con MNSP donde su alteración en LB sería más relevante, ya que, en ese modelo, el microambiente de contacto con las células que contienen su ligando causaría efectos diferentes; se evaluó únicamente en LB de la línea celular Ramos, donde más que el efecto activador, resaltamos la modulación en la expresión de esta proteína en la superficie del linfocito.

Por otro lado, el CD27 se identificó en los estudios como un marcador clave para determinar el estado de memoria, madurez y regulación celular de los linfocitos B. En experimentos que involucraron la exposición exógena de linfocitos B Ramos a la proteína GP63 o a activadores conocidos como LPS, PMA y CpG, no se observaron inducciones significativas en la expresión de CD27 de forma general. No obstante, se notó una menor intensidad media de fluorescencia (MFI) para CD27 con el tratamiento con CpG, aunque esta disminución se atribuyó potencialmente a una pérdida de muestra durante el procesamiento.

En contraste, cuando los LB fueron transducidos el MFI de CD27 disminuyó aproximadamente a la mitad en comparación con el control no estimulado. Esta notable reducción sugiere una posible inhibición en la maduración celular o una interferencia en las señales de activación debido a la presencia intracelular de GP63. Además, se observó que, incluso ante la estimulación con activadores clásicos, los LB que expresaban GP63 intracelularmente mostraron una escasa modulación de CD27, manteniendo sus niveles estables.

No existe evidencia directa de CD27 con vinculación a GP63 de *Leishmania* en la literatura. Sin embargo, su papel como marcador de LB de memoria y su capacidad para promover la diferenciación hacia células plasmáticas lo sitúan como un indicador de activación y maduración de LB.

Los resultados obtenidos revelan que la proteasa GP63 ejerce un alto impacto sobre la respuesta funcional de LB, afectando la viabilidad, proliferación, fenotipo de activación y finalmente tanto la producción de citoquinas como la secreción de inmunoglobulinas. Este nivel de modulación sobre mediadores inflamatorios y sobre la respuesta humoral resalta el papel multifacético de GP63 en la regulación de la respuesta inmune adaptativa.

En cuanto a las citoquinas, el TNF fue el marcador más regulado. La exposición exógena a GP63 (WT y mutante) indujo un incremento moderado de TNF en LB Ramos, mientras que en MNSP la respuesta fue más pronunciada, especialmente

con la forma mutante, alcanzando hasta seis veces los niveles del control. Este hallazgo sugiere que, en un ambiente inmunológico más complejo, la interacción célula-célula y las señales de citoquinas paracrinas potencian la respuesta inflamatoria, un fenómeno ausente en el sistema mono celular de los LB Ramos. En contraste, la expresión intracelular de GP63 WT en los LB Ramos condujo a una supresión marcada de TNF, con niveles indetectables en sobrenadante, lo que indica que la proteasa activa podría interferir directamente con la señalización proinflamatoria. La reversión parcial de este efecto con LPS o CpG respalda la hipótesis de un bloqueo selectivo de rutas específicas.

La IL-6 por su parte, se mantuvo ausente en todas las condiciones evaluadas, lo que indica que la modulación ejercida por GP63 pudo mantener inhibida la secreción de esta citoquina proinflamatoria. Mientras que, la IL-10, asociada a fenotipos reguladores (9), solo mostró incrementos discretos con GP63 WT en ensayos intracelulares de corta duración. Estos cambios modestos, junto con la supresión de TNF en LB Ramos, podrían reflejar un perfil más regulador que activador en condiciones específicas (231–233).

Se ha reportado que GP63 suprime la activación de vías de señalización intracelular proinflamatorias como las MAPK quinasas, NF- κ B, AP-1 y JAK/STAT, resultando en una disminución en la producción de óxido nítrico, IL-6 y TNF en células mieloides (macrófagos) (89,234,235). También, disminuye la activación del inflamósoma al cortar directamente componentes como NLRP3, pro-IL-1 β y TXNIP, lo que contribuye a la reducción de IL-1 β (55,236). Esto coincide con lo observado en nuestro modelo experimental donde el perfil inflamatorio evaluado está por debajo del control sin estímulo y del control de transducción de expresión de GFP.

En cuanto a la respuesta humoral, los datos muestran una inhibición consistente de la producción de IgM tanto con GP63 recombinante, como con su expresión intracelular, siendo este último contexto el de mayor magnitud. En la línea celular Ramos, la exposición a GP63 WT redujo significativamente la IgM soluble en

comparación con el control, con un efecto más marcado que la proteína mutante, lo que apunta a un papel clave de la actividad catalítica en la supresión de la secreción de la IgM. En MNSP, aunque los niveles basales fueron menores, la tendencia de reducción se mantuvo, lo que sugiere que este efecto es independiente del tipo de sistema celular y del ambiente que rodea al LB.

Con la expresión intracelular de GP63 WT se generó una inhibición robusta y dosis-dependiente, que no fue revertida por estímulos con (LPS, PMA o CpG), lo que indica una alteración sostenida del programa secretor de inmunoglobulinas. Esta supresión podría deberse a interferencias en rutas de activación y diferenciación hacia células plasmáticas, posiblemente mediadas por la degradación de moléculas de señalización clave o por cambios en el balance de citoquinas pro y antiinflamatorias, lo cual ya se ha asociado a GP63 en la literatura (237–239). Un hallazgo atípico fue el incremento de la expresión de IgM total al día 7 con MOI bajo (0.5), lo que sugiere que tal vez la producción de la IgM no está alterada, sino solo el proceso de secreción, lo cual tiene sentido teniendo en cuenta los reportes asociados a GP63 con la modulación del transporte vesicular y ambiente lisosomal (89), siendo esto un aspecto que requeriría estudios adicionales.

En conjunto, estos resultados posicionan a GP63 como un modulador de la función de los LB, capaz de alterar todos los aspectos evaluados en las células; la viabilidad, la proliferación, la expresión de marcadores de activación, la producción de citoquinas y la secreción de anticuerpos, de forma dependiente del contexto y de la dosis empleada de la proteína/lentivirus. En análisis exploratorios de enriquecimiento funcional, logramos unir las vías en común y coincide con la categoría de regulación de los LB (Anexo 4). Este patrón sugiere que GP63 podría contribuir, durante la modulación de la respuesta inmune, favoreciendo en algunos casos la supresión de funciones efectoras de LB con un perfil más regulador y, en otros, la amplificación de señales proinflamatorias mediadas por la interacción con otras poblaciones celulares.

7.5 Resumen de los hallazgos:

- I. La proteína GP63 de *Leishmania* ejerce un efecto citotóxico y anti proliferativo significativo dosis dependiente, sobre los linfocitos B humanos (línea Ramos), ya sea que se dosifique exógenamente o se exprese intracelularmente. La muerte celular está asociada principalmente a eventos apoptóticos, incluyendo la activación de Caspasa 3.
- II. Los efectos de GP63 sobre los marcadores de superficie celular y el fenotipo de los linfocitos B varían crucialmente según la vía de exposición. Con la exposición a GP63 WT recombinante, se induce un aumento significativo en la expresión de CD38 en LB Ramos y MNSP, lo que no se observa con la expresión intracelular de GP63. Mientras que, con la expresión intracelular, se inducen niveles más bajos de CD19 y una alta expresión de CD11b un marcador no típico en estas células. Este aumento de CD11b sugiere un posible cambio funcional o una reprogramación fenotípica aberrante de los LB, potencialmente de tipo regulador o anérgico.
- III. La exposición a GP63 (WT y mt recombinante), induce la producción de TNF en LB Ramos y MNSP, Sin embargo, la expresión intracelular de GP63 WT en LB Ramos conduce a una disminución significativa o incluso indetectable de TNF y una robusta inhibición de la secreción de IgM soluble, efectos no restaurados por estímulos activadores clásicos. En contraste, en el modelo más complejo de MNSP transducidos, se observan niveles elevados de TNF, atribuible a las diferentes subpoblaciones celulares (como monocitos, células NK o linfocitos T) en la respuesta inflamatoria colectiva inducida por GP63 en un microambiente inmunológico más fisiológico.

8.0 CONCLUSIONES GENERALES

- ✚ Los análisis *in silico* de acoplamiento y dinámica molecular, demuestran una interacción bioquímica favorable y robusta entre la metaloproteasa GP63 y la proteína Syk, validando a su vez la importancia del Glu (E) 265 para el mecanismo potencial de clivaje y que la mutación E265A desestabiliza por completo la función catalítica de la proteína.
- ✚ Se logró la producción de GP63 recombinante en las células HEK293T para la expresión transitoria de la proteasa, aunque con rendimientos bajos y una reducción progresiva de la viabilidad celular, probablemente asociada a la toxicidad de la proteína, logramos su validación funcional *in vitro*.
- ✚ Con la optimización y validación de nuevos constructos plasmídicos se obtuvo un lentivirus LV-MND-GP63 WT funcional con alta eficiencia de transducción en LB Ramos y MN5P.
- ✚ La proteasa GP63 modula la función de los LB humanos de forma dosis y contexto-dependiente. Presenta efectos citotóxicos y anti proliferativos mediados por apoptosis, altera marcadores de activación de manera diferencial e impacta tanto la producción de citoquinas, como la secreción de IgM. Particularmente, la aplicación exógena favorece la inducción de CD38 y TNF, mientras que la expresión intracelular reduce CD19, aumenta CD11b y suprime drásticamente TNF e IgM, sin reversión por estímulos activadores clásicos.

9.0 LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS

Si bien los hallazgos obtenidos aportan evidencia novedosa sobre el papel de GP63 en la modulación de la señalización de los LB, el estudio presenta algunas limitaciones que deben ser consideradas. En primer lugar, la producción de la proteína recombinante en células HEK293T mostró rendimientos bajos y una reducción de la viabilidad celular, lo que restringió la cantidad de proteína disponible y podría haber limitado la amplitud de los ensayos funcionales. De igual manera, aunque los análisis *in silico* y las validaciones con el mutante E265A fortalecen la hipótesis de un clivaje dirigido sobre Syk, no se alcanzó una confirmación definitiva del sitio y mecanismo de corte. Adicionalmente, los efectos diferenciales observados entre la aplicación exógena y la expresión intracelular de GP63 requieren estudios adicionales y aproximaciones proteómicas de mayor resolución, para determinar el alcance fisiológico y clínico de estas modulaciones.

Por esta razón sugerimos que, en fases futuras, se pueda ampliar la evaluación de GP63 a un mayor número de MNSP provenientes de donantes sanos, así como de pacientes con enfermedades autoinmunes o proinflamatorias, con el objetivo de determinar si la proteína es capaz de modular o revertir fenotipos inflamatorios característicos de estas células. Posteriormente, se validaría en modelos animales, tanto mediante la exposición exógena de GP63; por ejemplo, utilizando sistemas de liberación controlada como bombas de infusión, junto con o sin administración de citoquinas, como a través de la expresión endógena mediada por el vector lentiviral desarrollado.

Estas aproximaciones se evaluarían en modelos animales de enfermedades proinflamatorias o autoinmunes, con la finalidad de explorar el potencial inmunomodulador de GP63 *in vivo*. Asimismo, su aplicación podría extenderse a patologías como el cáncer, induciendo la muerte celular programada, abriendo la posibilidad de considerar a GP63 como una estrategia terapéutica innovadora.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Wen Y, Jing Y, Yang L, Kang D, Jiang P, Li N, et al. The regulators of BCR signaling during B cell activation. Vol. 1, Blood Science. Lippincott Williams and Wilkins; 2019. p. 119–29.
2. Woodland RT, Fox CJ, Schmidt MR, Hammerman PS, Opferman JT, Korsmeyer SJ, et al. Multiple signaling pathways promote B lymphocyte stimulator-dependent B-cell growth and survival. Blood. 2008 Jan 15;111(2):750–60.
3. Maddaly R, Pai G, Balaji S, Sivaramakrishnan P, Srinivasan L, Sunder SS, et al. Receptors and signaling mechanisms for B-lymphocyte activation, proliferation and differentiation - Insights from both in vivo and in vitro approaches. Vol. 584, FEBS Letters. 2010. p. 4883–94.
4. Kwak K, Akkaya M, Pierce SK. B cell signaling in context. Vol. 20, Nature Immunology. Nature Publishing Group; 2019. p. 963–9.
5. Ahsan NF, Lourenço S, Psyllou D, Long A, Shankar S, Bashford-Rogers R. The current understanding of the phenotypic and functional properties of human regulatory B cells (Bregs). Vol. 5, Oxford Open Immunology. Oxford University Press; 2024.
6. Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. Vol. 30, Annual Review of Immunology. 2012. p. 221–41.
7. Fillatreau S, Manz RA. Tolls for B cells. Vol. 36, European Journal of Immunology. 2006. p. 798–801.
8. He Y, Qian H, Liu Y, Duan L, Li Y, Shi G. The roles of regulatory B cells in cancer. Vol. 2014, Journal of Immunology Research. Hindawi Publishing Corporation; 2014.
9. Sakkas LI. Regulatory B cells in autoimmune rheumatic diseases. Mediterr J Rheumatol. 2017;28(2):75–9.
10. Tobón GJ, Pers JO, Cañas CA, Rojas-Villarraga A, Youinou P, Anaya JM. Are autoimmune diseases predictable? Vol. 11, Autoimmunity Reviews. 2012. p. 259–66.
11. Azizi G, Abolhassani H, Asgardoost MH, Alinia T, Yazdani R, Mohammadi J, et al. Autoimmunity in common variable immunodeficiency: epidemiology, pathophysiology and management. Expert Rev Clin Immunol. 2017;13(2):101–15.
12. Leandro MJ, De La Torre I. Translational Mini-Review Series on B Cell-Directed Therapies: The pathogenic role of B cells in autoantibody-associated autoimmune diseases - Lessons from B cell-depletion therapy. Vol. 157, Clinical and Experimental Immunology. 2009. p. 191–7.

13. Flammer JR, Rogatsky I. Minireview: Glucocorticoids in Autoimmunity: Unexpected Targets and Mechanisms. *Molecular Endocrinology*. 2011;25(7):1075–86.
14. Santos ALS, Branquinha MH, D'Avila-Levy CM. The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids: In the search for a function. *An Acad Bras Cienc*. 2006;78(4):687–714.
15. Kulkarni MM, McMaster WR, Kamysz E, Kamysz W, Engman DM, McGwire BS. The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing. *Mol Microbiol*. 2006;62(5):1484–97.
16. Corradin S, Ransijn A, Corradin G, Roggero MA, Schmitz AAP, Schneider P, et al. MARCKS-related protein (MRP) is a substrate for the *Leishmania* major surface protease leishmanolysin (gp63). *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(36):25411–8.
17. Hey AS, Theander, TG, Hviid, L, Hazrati SM, Kemp M, Kharazmi A. The Major Surface Glycoprotein (gp63) from *Leishmania* major and *Leishmania donovani* Cleaves CD4 Molecules on Human T Cells'. 1994.
18. McGwire BS, O'Connell WA, Chang KP, Engman DM. Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis. Implications for parasite virulence. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(11):8802–9.
19. Frommel TO, Button LL, Fujikura Y, McMaster WR. The major surface glycoprotein (GP63) is present in both life stages of *Leishmania*. 1990;38:25–32.
20. Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. Vol. 16, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2016. p. 581–92.
21. Irving M, Lanitis E, Migliorini D, Ivics Z, Guedan S. Choosing the Right Tool for Genetic Engineering: Clinical Lessons from Chimeric Antigen Receptor-T Cells. *Hum Gene Ther*. 2021 Oct 1;32(19–20):1044–58.
22. Labbé RP, Vessillier S, Rafiq QA. Lentiviral vectors for t cell engineering: Clinical applications, bioprocessing and future perspectives. Vol. 13, *Viruses*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2021.
23. Shah K, Leandro M, Cragg M, Kollert F, Schuler F, Klein C, et al. Disrupting B and T-cell collaboration in autoimmune disease: T-cell engagers versus CAR T-cell therapy? Vol. 217, *Clinical and Experimental Immunology*. Oxford University Press; 2024. p. 15–30.

24. Barcellini W, Fattizzo B, Zaninoni A. Current and emerging treatment options for autoimmune hemolytic anemia. *Expert Rev Clin Immunol* [Internet]. 2018;14(10):857–72. Available from: <https://doi.org/10.1080/1744666X.2018.1521722>
25. Jin X, Xu Q, Pu C, Zhu K, Lu C, Jiang Y, et al. Therapeutic efficacy of anti-CD19 CAR-T cells in a mouse model of systemic lupus erythematosus. *Cell Mol Immunol*. 2021 Aug 1;18(8):1896–903.
26. Mackensen A, Müller F, Mougiakakos D, Böltz S, Wilhelm A, Aigner M, et al. Anti-CD19 CAR T cell therapy for refractory systemic lupus erythematosus. *Nat Med*. 2022 Oct 1;28(10):2124–32.
27. Blache U, Tretbar S, Koehl U, Mougiakakos D, Fricke S. CAR T cells for treating autoimmune diseases. Vol. 9, *RMD Open*. BMJ Publishing Group; 2023.
28. Pecher AC, Hensen L, Lengerke C, Henes J. The Future of CAR T Therapeutics to Treat Autoimmune Disorders. *Molecular Diagnosis and Therapy*. Adis; 2024.
29. Abeles I, Palma C, Meednu N, Payne AS, Looney RJ, Anolik JH. Annual Review of Immunology B Cell-Directed Therapy in Autoimmunity. 2024; Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-083122->
30. Colantuoni M, Hernandez RJ, Pettinato E, Basso-Ricci L, Magnani L, Andolfi G, et al. Constitutive IL-1RA production by modified immune cells protects against IL-1-mediated inflammatory disorders. *Sci Transl Med*. 2023 May 31;15(698).
31. Wilkins O, Keeler AM, Flotte TR. CAR T-Cell Therapy: Progress and Prospects. Vol. 28, *Human Gene Therapy Methods*. Mary Ann Liebert Inc.; 2017. p. 61–6.
32. Gutierrez-Guerrero A, Cosset FL, Verhoeven E. Lentiviral Vector Pseudotypes: Precious Tools to Improve Gene Modification of Hematopoietic Cells for Research and Gene Therapy. Vol. 12, *Viruses*. MDPI AG; 2020.
33. Krickau T, Naumann-Bartsch N, Aigner M, Kharboutli S, Kretschmann S, Spoerl S, et al. CAR T-cell therapy rescues adolescents with rapidly progressive lupus nephritis from haemodialysis. Vol. 403, *The Lancet*. Elsevier B.V.; 2024. p. 1627–30.
34. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2017 Dec 28;377(26):2531–44.
35. Nguyen MH, Huang FF, O’neill SG. Patient-reported outcomes for quality of life in sle: Essential in clinical trials and ready for routine care. *J Clin Med*. 2021 Aug 2;10(16).

36. Yao C. Major surface protease of trypanosomatids: One size fit all? Vol. 78, *Infection and Immunity*. 2010. p. 22–31.
37. Yao C, Donelson JE, Wilson ME. Internal and surface-localized major surface proteases of *Leishmania* spp. and their differential release from promastigotes. *Eukaryot Cell*. 2007 Oct;6(10):1905–12.
38. Bouvier J, Etges RJ, Bordier C. Identification and purification of membrane and soluble forms of the major surface protein of *Leishmania* promastigotes. *Journal of Biological Chemistry*. 1985;260(29):15504–9.
39. Hassani K, Shio MT, Martel C, Faubert D, Olivier M. Absence of metalloprotease GP63 alters the protein content of leishmania exosomes. *PLoS One*. 2014;9(4).
40. Schlagenhauf E, Etges R, Metcalf P. The crystal structure of the *Leishmania* major surface proteinase leishmanolysin (gp63). *Structure*. 1998;6(8):1035–46.
41. Hallé M, Gomez MA, Stuiblé M, Shimizu H, McMaster WR, Olivier M, et al. The *Leishmania* surface protease GP63 cleaves multiple intracellular proteins and actively participates in p38mitogen-activated protein kinase inactivation. *Journal of Biological Chemistry*. 2009 Mar 13;284(11):6893–908.
42. Gomez MA, Contreras I, Hallé M, Tremblay ML, McMaster RW, Olivier M. *Leishmania* GP63 Alters Host Signaling Through Cleavage-Activated Protein Tyrosine Phosphatases [Internet]. Available from: www.SCIENCESIGNALING.org
43. Bouvier J, Schneider P, Etges R, Bordier C, Bouvier J, Bordier C. Peptide Substrate Specificity of the Membrane-Bound Metalloprotease of *Leishmania*. *Biochemistry*. 1990;29(43):10113–9.
44. Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical-biological functions and (Q)SARs. Vol. 15, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2007. p. 2223–68.
45. Löffek S, Schilling O, Franzke CW. Series “matrix metalloproteinases in lung health and disease” edited by J. Müller-Quernheim and O. Eickelberg number 1 in this series: Biological role of matrix metalloproteinases: A critical balance. Vol. 38, *European Respiratory Journal*. 2011. p. 191–208.
46. López-Otín C, Bond JS. Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease. Vol. 283, *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.; 2008. p. 30433–7.

47. Isnard A, Shio MT, Olivier M. Impact of Leishmania metalloprotease GP63 on macrophage signaling. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2012;2(May):1–9. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2012.00072/abstract>
48. Antonia AL, Gibbs KD, Trahair ED, Pittman KJ, Martin AT, Schott BH, et al. Pathogen Evasion of Chemokine Response Through Suppression of CXCL10. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019 Aug 7;9.
49. Mosser Dm, Brittingham A. Leishmania, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology* [Internet]. 1997;115(7):S0031182097001789. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182097001789
50. Brittingham A, Morrison C 1, McMaster + W Robert, Mcgwire BS, Chang KP, Mosser2 DM. Role of the Leishmania Surface Protease gp63 in Complement Fixation, Cell Adhesion, and Resistance to Complement-Mediated Lysis'. 1995.
51. Olivier M, Atayde VD, Isnard A, Hassani K, Shio MT. Leishmania virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes Infect*. 2012;14(15):1377–89.
52. Vivarini C, Miqueline M, Calegari-silva TC, Santos GRRM Dos, Teixeira KL, Saliba AM, et al. The human parasite Leishmania amazonensis downregulates iNOS expression via NF- κ B p50 / p50 homodimer : role of the PI3K / Akt pathway. 2015.
53. Calegari-silva TC, Pereira RMS, Dione L, De-melo B, Saraiva EM, Soares DC, et al. NF- κ B-mediated repression of iNOS expression in Leishmania amazonensis macrophage infection. 2009;127:19–26.
54. Matheoud D, Moradin N, Bellemare-Pelletier A, Shio MT, Hong WJ, Olivier M, et al. Leishmania evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8. *Cell Host Microbe*. 2013;14(1):15–25.
55. Shio MT, Christian JG, Jung JY, Chang KP, Olivier M. PKC/ROS-mediated NLRP3 inflammasome activation is attenuated by leishmania zinc- metalloprotease during infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Jun 26;9(6).
56. Gregory DJ, Godbout M, Contreras I, Forget G, Olivier M. A novel form of NF- κ B is induced by Leishmania infection: Involvement in macrophage gene expression. *Eur J Immunol*. 2008;38(4):1071–81.
57. Gregory DJ, Whitcombe LA, Olivier M. Role of Host Protein Tyrosine Phosphatase SHP-1 in Leishmania donovani -Induced Inhibition of Nitric Oxide Production. 2006;74(11):6272–9.
58. Chaudhary KK, Mishra N. A Review on Molecular Docking: Novel Tool for Drug Discovery Central Bringing Excellence in Open Access A Review on Molecular Docking: Novel Tool for

- Drug Discovery. A Review on Molecular Docking: Novel Tool for Drug Discovery JSM Chem [Internet]. 2016;4(3):1029. Available from: www.pdb.org.
59. Agu PC, Afiukwa CA, Orji OU, Ezeh EM, Ofoke IH, Ogbu CO, et al. Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. *Sci Rep*. 2023 Dec 1;13(1).
 60. Sahoo RN, Pattanaik S, Pattnaik G, Mallick S, Mohapatra R. Review on the use of Molecular Docking as the First Line Tool in Drug Discovery and Development [Internet]. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Available from: www.ijpsonline.com
 61. Eberhardt J, Santos-Martins D, Tillack AF, Forli S. AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *J Chem Inf Model* [Internet]. 2021 Aug 23;61(8):3891–8. Available from: <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203>
 62. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*. 2010 Jan 30;31(2):455–61.
 63. Van Zundert GCP, Rodrigues JPGLM, Trellet M, Schmitz C, Kastiris PL, Karaca E, et al. The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. *J Mol Biol*. 2016 Feb 22;428(4):720–5.
 64. R.V. Honorato, M.E. Trellet, B. Jiménez-García, J.J. Schaarschmidt, M. Giulini, V. Reys, et al. The HADDOCK2.4 web server: A leap forward in integrative modelling of biomolecular complexes. *Nat Protoc*. 2024 Nov 19;19(11):3219–41.
 65. Kozakov D, Hall DR, Xia B, Porter KA, Padhorny D, Yueh C, et al. The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nat Protoc*. 2017 Feb 1;12(2):255–78.
 66. Vajda S, Yueh C, Beglov D, Bohnuud T, Mottarella SE, Xia B, et al. new additions to the ClusPro server motivated by CAPRI. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. 2017 Mar 1;85(3):435–44.
 67. Desta IT, Porter KA, Xia B, Kozakov D, Vajda S. Performance and Its Limits in Rigid Body Protein-Protein Docking. *Structure*. 2020 Sep 1;28(9):1071-1081.e3.
 68. Kozakov D, Beglov D, Bohnuud T, Mottarella SE, Xia B, Hall DR, et al. How good is automated protein docking? *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. 2013 Dec;81(12):2159–66.
 69. Stevens JA, Grünewald F, van Tilburg PAM, König M, Gilbert BR, Brier TA, et al. Molecular dynamics simulation of an entire cell. *Front Chem*. 2023 Jan 18;11.

70. Hospital A, Goñi JR, Orozco M, Gelpí JL. Molecular dynamics simulations: Advances and applications. Vol. 8, *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*. Dove Medical Press Ltd; 2015. p. 37–47.
71. Kmiecik S, Gront D, Kolinski M, Wieteska L, Dawid AE, Kolinski A. Coarse-Grained Protein Models and Their Applications. Vol. 116, *Chemical Reviews*. American Chemical Society; 2016. p. 7898–936.
72. Sugita Y, Okamoto Y. Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding [Internet]. Available from: www.elsevier.nl/locate/cplett
73. Gong X, Zhang Y, Chen J. Advanced sampling methods for multiscale simulation of disordered proteins and dynamic interactions. Vol. 11, *Biomolecules*. MDPI; 2021.
74. GROMACS Documentation Release 2025.2 GROMACS development team. 2025.
75. Isgro T, Phillips J, Sotomayor M, Villa E, Yu H, Tanner D, et al. NAMD TUTORIAL [Internet]. 2017. Available from: <http://www.ks.uiuc.edu/Training/Tutorials/>
76. Brooks BR, Brooks CL, Mackerell AD, Nilsson L, Petrella RJ, Roux B, et al. CHARMM: The biomolecular simulation program. *J Comput Chem*. 2009 Jul 30;30(10):1545–614.
77. Hollingsworth SA, Dror RO. *Molecular Dynamics Simulation for All*. Vol. 99, *Neuron*. Cell Press; 2018. p. 1129–43.
78. Santos Lucianna H. S. and Ferreira RS and CER. Integrating Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations. In: de Azevedo Jr. WF, editor. *Docking Screens for Drug Discovery* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2019. p. 13–34. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9752-7_2
79. Da A, Wu-Lu M, Dragelj J, Mroginiski MA, Ebrahimi KH. Multi-structural molecular docking (MOD) combined with molecular dynamics reveal the structural requirements of designing broad-spectrum inhibitors of SARS-CoV-2 entry to host cells. *Sci Rep*. 2023 Dec 1;13(1).
80. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank [Internet]. Vol. 28, *Nucleic Acids Research*. 2000. Available from: <http://www.rcsb.org/pdb/status.html>
81. Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, Kong J, Barrett AJ. MEROPS: The peptidase database. *Nucleic Acids Res*. 2008 Jan;36(SUPPL. 1).
82. Rawlings ND, Barrett AJ, Thomas PD, Huang X, Bateman A, Finn RD. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res*. 2018 Jan 1;46(D1):D624–32.

83. Antonia AL, Barnes AB, Martin AT, Wang L, Ko DC. Variation in leishmania chemokine suppression driven by diversification of the gp63 virulence factor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021 Oct 1;15(10).
84. Varadi M, Anyango S, Deshpande M, Nair S, Natassia C, Yordanova G, et al. AlphaFold Protein Structure Database: Massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res*. 2022 Jan 7;50(D1):D439–44.
85. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021 Aug 26;596(7873):583–9.
86. Laskowski RA, Jabłońska J, Pravda L, Vařeková RS, Thornton JM. PDBsum: Structural summaries of PDB entries. *Protein Science*. 2018 Jan 1;27(1):129–34.
87. Protein Data Bank in Europe <http://pdbe.org> PISA Tutorial PDBe PDBePISA (Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies) <http://pdbe.org/pisa> [Internet]. Available from: <http://pdbe.org>
88. Stone JE, Aksimentiev A, Arkhipov A, Birnbaum R, Brunner R, Cohen J, et al. Using VMD [Internet]. 2019. Available from: <http://www.ks.uiuc.edu/Training/Tutorials/>
89. Martínez-López M, Soto M, Iborra S, Sancho D. Leishmania Hijacks myeloid cells for immune escape. Vol. 9, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2018.
90. Monzote L. Antileishmanial Patents Antileishmanial Current Drugs and Relevant Patents. 2011;(CI):1–26.
91. Ghosh M, Roy K, Roy S. Immunomodulatory effects of antileishmanial drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013;68(12):2834–8.
92. Barrera MC, Rojas LJ, Weiss A, Fernandez O, McMahon-Pratt D, Saravia NG, et al. Profiling gene expression of antimony response genes in *Leishmania (Viannia) panamensis* and infected macrophages and its relationship with drug susceptibility. *Acta Trop*. 2017 Dec 1;176:355–63.
93. Geahlen RL. Getting Syk: Spleen tyrosine kinase as a therapeutic target. Vol. 35, *Trends in Pharmacological Sciences*. Elsevier Ltd; 2014. p. 414–22.
94. Tsang E, Giannetti AM, Shaw D, Dinh M, Tse JKY, Gandhi S, et al. Molecular mechanism of the Syk activation switch. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(47):32650–9.
95. Grädler U, Schwarz D, Dresing V, Musil D, Bomke J, Frech M, et al. Structural and biophysical characterization of the Syk activation switch. *J Mol Biol*. 2013 Jan 23;425(2):309–33.

96. Mócsai A, Ruland J, Tybulewicz VJ. The SYK tyrosine kinase: A crucial player in diverse biological functions. Vol. 10, *Nature Reviews Immunology*. 2010. p. 387–402.
97. Cheng AM, Rowley B, Pao W, Hayday A, Bolen J, Pawson T. Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nat Immunol*. 1985;378:303–6.
98. Krishnan S, Juang YT, Chowdhury B, Magilavy A, Fisher CU, Nguyen H, et al. Differential Expression and Molecular Associations of Syk in Systemic Lupus Erythematosus T Cells. *The Journal of Immunology*. 2008 Dec 1;181(11):8145–52.
99. Erdei A. Syk is indispensable for CpG-induced activation and differentiation of human B cells. 2014.
100. Collu F, Cascella M. Multidrug Resistance and Efflux Pumps: Insights from Molecular Dynamics Simulations. *Curr Top Med Chem* [Internet]. 2013;13(24):3165–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24200357> \n<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1568-0266&volume=13&issue=24&spage=3165>
101. Bianchini G, Bocedi A, Ascenzi P, Gavuzzo E, Mazza F, Aschi M. Molecular dynamics simulation of Leishmania major surface metalloprotease GP63 (leishmanolysin). *Proteins: Structure, Function and Genetics*. 2006 Aug 1;64(2):385–90.
102. Mercado-Camargo J, Cervantes-Ceballos L, Vivas-Reyes R, Olmo-Fernández E, Gómez-Estrada H. MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION OF FOUR BIFLAVONOIDS WITH THE LEISHMANOLYSIN (gp63) PROTEIN OF Leishmania major. Available from: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2238863/v1>
103. Bouvier J, Schneider P, Etges R. Leishmanolysin: Surface metalloproteinase of Leishmania. *Methods Enzymol*. 1995;248(C):614–33.
104. Bianchini G, Bocedi A, Ascenzi P, Gavuzzo E, Mazza F, Aschi M. Molecular dynamics simulation of Leishmania major surface metalloprotease GP63 (leishmanolysin). *Proteins: Structure, Function and Genetics*. 2006 Aug 1;64(2):385–90.
105. Macip G, Garcia-Segura P, Mestres-Truyol J, Saldivar-Espinoza B, Ojeda-Montes MJ, Gimeno A, et al. Haste makes waste: A critical review of docking-based virtual screening in drug repurposing for SARS-CoV-2 main protease (M-pro) inhibition. Vol. 42, *Medicinal Research Reviews*. John Wiley and Sons Inc; 2022. p. 744–69.
106. Razaghi A, Owens L, Heimann K. Review of the recombinant human interferon gamma as an immunotherapeutic: Impacts of production platforms and glycosylation. Vol. 240, *Journal of Biotechnology*. Elsevier B.V.; 2016. p. 48–60.

107. Kim JY, Kim YG, Lee GM. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: Current state and further potential. Vol. 93, Applied Microbiology and Biotechnology. 2012. p. 917–30.
108. Button LL, McMaster AW. Leishmania major: Production of Recombinant gp63 , Its Antigenicity and Immunogenicity in Mice animal models for leishmaniasis and are at-candidates for synthetic , molecu- defined vaccines (Handman and mastigotes to macrophages is a receptor- mediated. 1990;427435.
109. Button LL, McMaster AW. Leishmania major: Production of Recombinant gp63, Its Antigenicity and Immunogenicity in Mice. Vol. 70, EXPERIMENTAL PARASITOLOGY. 1990.
110. Button LL, Reiner NE, McMaster WR. Modification of GP63 genes from diverse species of Leishmania for expression of recombinant protein at high levels in Escherichia coli. Mol Biochem Parasitol. 1991;44(2):213–24.
111. Button LL, Wilson G, Astell CR, McMaster WR. Recombinant Leishmania surface glycoprotein GP63 is secreted in the baculovirus expression system as a latent metalloproteinase. Gene. 1993;134(1):75–81.
112. Thomas P, Smart T. Thomas, P. & Smart, T.G. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. J. Pharmacol. Toxicol. Methods 51, 187-200. J Pharmacol Toxicol Methods. 2005 May 1;51:187–200.
113. Kim J, Eberwine J. RNA: State memory and mediator of cellular phenotype. Trends Cell Biol. 2010 Jun;20(6):311–8.
114. Sul JY, Kim TK, Lee JH, Eberwine J. Perspectives on cell reprogramming with RNA. Vol. 30, Trends in Biotechnology. 2012. p. 243–9.
115. Sena-Esteves M, Gao G. Introducing genes into mammalian cells: Viral vectors. Vol. 2020, Cold Spring Harbor Protocols. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2020. p. 297–329.
116. Orvain C, Boulch M, Bousso P, Allanore Y, Avouac J. Is there a place for CAR-T cells in the treatment of chronic autoimmune rheumatic diseases? Available from: <https://pasteur.hal.science/pasteur-03261481>
117. Ohno R, Nakamura A. Advancing autoimmune Rheumatic disease treatment: CAR-T Cell Therapies - Evidence, Safety, and future directions. Vol. 67, Seminars in Arthritis and Rheumatism. W.B. Saunders; 2024.
118. High KA, Roncarolo MG. Gene Therapy. New England Journal of Medicine [Internet]. 2019 Aug 1;381(5):455–64. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1706910>

119. Bulcha JT, Wang Y, Ma H, Tai PWL, Gao G. Viral vector platforms within the gene therapy landscape. Vol. 6, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2021.
120. Rintz E, Higuchi T, Kobayashi H, Galileo DS, Wegrzyn G, Tomatsu S. Promoter considerations in the design of lentiviral vectors for use in treating lysosomal storage diseases. Vol. 24, *Molecular Therapy Methods and Clinical Development*. Cell Press; 2022. p. 71–87.
121. Singh V, Khan N, Jayandharan GR. Vector engineering, strategies and targets in cancer gene therapy. Vol. 29, *Cancer Gene Therapy*. Springer Nature; 2022. p. 402–17.
122. De Ravin SS, Liu S, Sweeney CL, Brault J, Whiting-Theobald N, Ma M, et al. Lentivector cryptic splicing mediates increase in CD34+ clones expressing truncated HMGA2 in human X-linked severe combined immunodeficiency. *Nat Commun*. 2022 Dec 1;13(1).
123. Sweeney CL, Merling RK, De Ravin SS, Choi U, Malech HL. Gene editing in chronic granulomatous disease. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2019. p. 623–65.
124. De Ravin SS, Wu X, Moir S, Anaya-O'Brien S, Kwatema N, Littell P, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *Sci Transl Med*. 2016 Apr 20;8(335).
125. ABM (applied biological materials). The Lentivirus System – Introduction. 2024. The Basics of the Recombinant Lentivirus System.
126. Thermo Fisher Scientific. What's in the ExpiCHO Expression System? ExpiCHO Expression System.
127. Maasho K, Marusina A, Reynolds NM, Coligan JE, Borrego F. Efficient gene transfer into the human natural killer cell line, NKL, using the Amaxa nucleofection system™. *J Immunol Methods* [Internet]. 2004;284(1):133–40. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002217590300423X>
128. Handman E. Leishmaniasis : Current Status of Vaccine Development Leishmaniasis : Current Status of Vaccine Development. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(2):229–43.
129. Murray PJ, Handman E, Glaser TA, Spithill TW. Leishmania major: Expression and gene structure of the glycoprotein 63 molecule in virulent and avirulent clones and strains. *Exp Parasitol*. 1990;71(3):294–304.
130. Shaebani AA, McMaster RW, Shahbazzadeh D, Karimi M, Mahboudi F. Expression of Gp63 Gene from NIH Strain of Leishmania major in Pichia pastoris. Vol. 5, *Iranian Biomedical Journal*. 2001.

131. Roberts AJ, Ong HB, Clare S, Brandt C, Harcourt K, Franssen SU, et al. Systematic identification of genes encoding cell surface and secreted proteins that are essential for in vitro growth and infection in *Leishmania donovani*. *PLoS Pathog*. 2022 Feb 1;18(2).
132. Derouazi M, Girard P, Van Tilborgh F, Iglesias K, Muller N, Bertschinger M, et al. Serum-free large-scale transient transfection of CHO cells. *Biotechnol Bioeng*. 2004 Aug 20;87(4):537–45.
133. Zhong X, Ma W, Meade CL, Tam AS, Llewellyn E, Cornell R, et al. Transient CHO expression platform for robust antibody production and its enhanced N-glycan sialylation on therapeutic glycoproteins. *Biotechnol Prog* [Internet]. 2019 Jan 1;35(1):e2724. Available from: <https://doi.org/10.1002/btpr.2724>
134. Mark JKK, Lim CSY, Nordin F, Tye GJ. Expression of mammalian proteins for diagnostics and therapeutics: a review. Vol. 49, *Molecular Biology Reports*. Springer Science and Business Media B.V.; 2022. p. 10593–608.
135. Kwon K, Hasseman J, Latham S, Grose C, Do Y, Fleischmann RD, et al. Recombinant expression and functional analysis of proteases from *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis*, and *Yersinia pestis*. *BMC Biochem*. 2011;12(1).
136. Migani D, Smales CM, Bracewell DG. Effects of lysosomal biotherapeutic recombinant protein expression on cell stress and protease and general host cell protein release in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Prog*. 2017 May 1;33(3):666–76.
137. Lebendiker M. Purification and Quality Control of Recombinant Proteins Expressed in Mammalian Cells: A Practical Review. In: Hacker DL, editor. *Recombinant Protein Expression in Mammalian Cells: Methods and Protocols* [Internet]. New York, NY: Springer US; 2024. p. 329–53. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3878-1_21
138. Watanabe M, Fujihara C, Radtke AJ, Chiang YJ, Bhatia S, Germain RN, et al. Co-stimulatory function in primary germinal center responses : CD40 and B7 are required on distinct antigen- presenting cells. *J Exp Med*. 2010;214(9):2795–810.
139. Zhou H jun, Pham L V, Tamayo AT, Fu L, Yoshimura LC, Ford RJ. Nuclear CD40 interacts with c-Rel and enhances proliferation in aggressive B-cell lymphoma. *Blood journal*. 2016;110(6):2121–8.
140. Anbazhagan K, Singh AR, Isabelle P, Stella I, Naomi T, Bissac E, et al. Human Pre-B cell receptor signal transduction : evidence for distinct roles of PI3kinase and MAP-kinase signalling pathways. 2013.

141. Fragoso R, Ren D, Zhang X, Su MWC, Burakoff SJ, Jin YJ. Lipid Raft Distribution of CD4 Depends on its Palmitoylation and Association with Lck, and Evidence for CD4-Induced Lipid Raft Aggregation as an Additional Mechanism to Enhance CD3 Signaling. *The Journal of Immunology*. 2003;170(2):913–21.
142. Wortis HH, Teutsch M, Higer M, Zheng J, Parkert DC. B-cell activation by crosslinking of surface IgM or ligation of CD40 involves alternative signal pathways and results in different B-cell phenotypes [Internet]. Vol. 92, *Immunology*. 1995. Available from: <https://www.pnas.org>
143. Roders N, Herr F, Ambroise G, Thaunat O, Portier A, Vazquez A, et al. SYK inhibition induces apoptosis in germinal center-like B cells by modulating the antiapoptotic protein myeloid cell Leukemia-1, affecting B-cell activation and antibody production. *Front Immunol*. 2018 Apr 24;9(APR).
144. Kawai T, Akira S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity* [Internet]. 2011 May 27;34(5):637–50. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.006>
145. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* [Internet]. 2010;11(5):373–84. Available from: <https://doi.org/10.1038/ni.1863>
146. Jansen K, Cevhertas L, Ma S, Satitsuksanoa P, Akdis M, van de Veen W. Regulatory B cells, A to Z. Vol. 76, *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. John Wiley and Sons Inc; 2021. p. 2699–715.
147. Fagarasan S, Honjo T. T-Independent Immune Response: New Aspects of B Cell Biology. *Science* (1979) [Internet]. 2000 Oct 6;290(5489):89–92. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.290.5489.89>
148. Kumagai Y, Takeuchi O, Akira S. Pathogen recognition by innate receptors. *Journal of Infection and Chemotherapy* [Internet]. 2008 Jan 1;14(2):86–92. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10156-008-0596-1>
149. Mullard A. FDA approves first-in-class SYK inhibitor. *Nat Rev Drug Discov*. 2018 May 30;17(6):385.
150. Currie KS, Kropf JE, Lee T, Blomgren P, Xu J, Zhao Z, et al. Discovery of GS-9973, a selective and orally efficacious inhibitor of spleen tyrosine kinase. *J Med Chem*. 2014 May 8;57(9):3856–73.

151. Obergfell A, Eto K, Mocsai A, Buensuceso C, Moores SL, Brugge JS, et al. Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *Journal of Cell Biology*. 2002;157(2):265–75.
152. Kulathu Y, Hobeika E, Turchinovich G, Reth M. The kinase Syk as an adaptor controlling sustained calcium signalling and B-cell development. *EMBO Journal*. 2008;27(9):1333–44.
153. Heizmann B, Reth M, Infantino S. Syk is a dual-specificity kinase that self-regulates the signal output from the B-cell antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Oct 26;107(43):18563–8.
154. Pone EJ, Zan H, Zhang J, Al-Qahtani A, Xu Z, Casali P. Toll-like Receptors and B-cell Receptors Synergize to Induce Immunoglobulin Class Switch DNA Recombination: Relevance to Microbial Antibody Responses.
155. Kurosaki T, Kometani K, Ise W. Memory B cells. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2015;15(3):149–59. Available from: <https://doi.org/10.1038/nri3802>
156. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(4):1–14.
157. Cerutti A, Cols M, Puga I. Marginal zone B cells: Virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. Vol. 13, *Nature Reviews Immunology*. 2013. p. 118–32.
158. Blandino R, Baumgarth N. Secreted IgM: New tricks for an old molecule. Vol. 106, *Journal of Leukocyte Biology*. John Wiley and Sons Inc.; 2019. p. 1021–34.
159. Matsumoto ML. Annual Review of Immunology Downloaded from www.annualreviews.org. Guest (guest) IP: 186.27.239.30. 2025;09:30. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-101320->
160. Wei H, Wang JY. Role of polymeric immunoglobulin receptor in IgA and IgM transcytosis. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2021. p. 1–20.
161. Jones K, Savulescu AF, Brombacher F, Hadebe S. Immunoglobulin M in Health and Diseases: How Far Have We Come and What Next? Vol. 11, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
162. Depoil D, Fleire S, Treanor BL, Weber M, Harwood NE, Marchbank KL, et al. CD19 is essential for B cell activation by promoting B cell receptor–antigen microcluster formation in response to membrane-bound ligand. *Nat Immunol* [Internet]. 2008;9(1):63–72. Available from: <https://doi.org/10.1038/ni1547>

163. Adebajo OA, Anandatheerthavarada HK, Koval AP, Moonga BS, Biswas G, Sun L, et al. A new function for CD38/ADP-ribosyl cyclase in nuclear Ca²⁺ homeostasis. *Nat Cell Biol* [Internet]. 1999;1(7):409–14. Available from: <https://doi.org/10.1038/15640>
164. Romero-Ramírez H, Morales-Guadarrama MT, Pelayo R, López-Santiago R, Santos-Argumedo L. CD38 expression in early B-cell precursors contributes to extracellular signal-regulated kinase-mediated apoptosis. *Immunology*. 2015 Feb 1;144(2):271–81.
165. Camponeschi A, Kläsener K, Sundell T, Lundqvist C, Manna PT, Ayoubzadeh N, et al. Human CD38 regulates B cell antigen receptor dynamic organization in normal and malignant B cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2022;219(9).
166. Borriello F, Sethna MP, Boyd SD, Schweitzer AN, Tivol EA, Jacoby D, et al. B7-1 and B7-2 Have Overlapping, Critical Roles in Immunoglobulin Class Switching and Germinal Center Formation. *Immunity* [Internet]. 1997 Mar 1;6(3):303–13. Available from: [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80333-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80333-7)
167. Grimsholm O. CD27 on human memory B cells-more than just a surface marker. Vol. 213, *Clinical and Experimental Immunology*. Oxford University Press; 2023. p. 164–72.
168. Agematsu K, Hokibara S, Nagumo H, Komiyama A. CD27: a memory B-cell marker. *Immunol Today* [Internet]. 2000 May 1;21(5):204–6. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(00\)01605-4](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(00)01605-4)
169. Ma BY, Yoshida K, Baba M, Nonaka M, Matsumoto S, Kawasaki N, et al. The lectin Jacalin induces human B-lymphocyte apoptosis through glycosylation-dependent interaction with CD45. *Immunology*. 2009;127(4):477–88.
170. Rheinländer A, Schraven B, Bommhardt U. CD45 in human physiology and clinical medicine. *Immunol Lett* [Internet]. 2018;196:22–32. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165247817305564>
171. Bodis G, Toth V, Schwarting A. Role of Human Leukocyte Antigens (HLA) in Autoimmune Diseases. In: *HLA Typing: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology. Sebastian. Springer Nature; 2018.
172. Pinet V, Vergelli M, Martini R, Bakke O, Long EO. Antigen presentation mediated by recycling of surface HLA-DR molecules. *Nature* [Internet]. 1995;375(6532):603–6. Available from: <https://doi.org/10.1038/375603a0>
173. Zhou J, Zhuang Z, Li J, Feng Z. Significance of the cGAS-STING Pathway in Health and Disease. Vol. 24, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.

174. Hopfner KP, Hornung V. Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS–STING signalling. Vol. 21, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Research; 2020. p. 501–21.
175. Zhou M, Dascani P, Ding C, Kos JT, Tieri D, Lin X, et al. Integrin CD11b Negatively Regulates B Cell Receptor Signaling to Shape Humoral Response during Immunization and Autoimmunity. *The Journal of Immunology*. 2021 Oct 1;207(7):1785–97.
176. Park S, Sim H, Kim HI, Jeong D, Wu G, Cho SY, et al. CD11b regulates antibody class switching via induction of AID. *Mol Immunol*. 2017 Jul 1;87:47–59.
177. Campelo CM, Pinheiro IC, de Melo Tavares B, Alves de Lima Henn G, Fernandes C, Albuquerque-Pinto LC, et al. Modulation in the expression of type 1 (CR1/CD35) and type 3 (CR3/CD11b) complement receptors on leukocytes from patients with Visceral leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 2020 Nov 1;218.
178. Nagai K, Fujii W, Yamagishi J, Sanjoba C, Goto Y. Inflammatory CD11b+ Macrophages Produce BAFF in Spleen of Mice Infected with *Leishmania donovani*. *Pathogens*. 2024 Mar 1;13(3).
179. Passos LSA, Magalhães LMD, Soares RP, Marques AF, Alves MLR, Giunchetti RC, et al. Activation of human CD11b+ B1 B-cells by *Trypanosoma cruzi*-derived proteins is associated with protective immune response in human chagas disease. *Front Immunol*. 2019;10(JAN).
180. Mackay F, Schneider P. Cracking the BAFF code. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2009;9(7):491–502. Available from: <https://doi.org/10.1038/nri2572>
181. Mecklenbräuker I, Kalled SL, Leitges M, Mackay F, Tarakhovsky A. Regulation of B-cell survival by BAFF-dependent PKC δ -mediated nuclear signalling. *Nature* [Internet]. 2004;431(7007):456–61. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature02955>
182. Woo M, Hakem R, Furlonger C, Hakem A, Duncan GS, Sasaki T, et al. Caspase-3 regulates cell cycle in B cells: a consequence of substrate specificity. *Nat Immunol* [Internet]. 2003;4(10):1016–22. Available from: <https://doi.org/10.1038/ni976>
183. Bryant VL, Hodgkin PD. Life, death, and antibodies. *Science* (1979) [Internet]. 2017 Oct 13;358(6360):171–2. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.aap8728>
184. Siegel RM. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2006;6(4):308–17. Available from: <https://doi.org/10.1038/nri1809>
185. Klein G, Giovanella B, Westman A, Stehlin JS, Mumford D. An EBV-Genome-Negative Cell Line Established from an American Burkitt Lymphoma; Receptor Characteristics. EBV Infectibility and Permanent Conversion into EBV-Positive Sublines by in vitro Infection. *Intervirology* [Internet]. 2008 Jul 29;5(6):319–34. Available from: <https://doi.org/10.1159/000149930>

186. Voss JE, Gonzalez-Martin A, Andrabi R, Fuller RP, Murrell B, McCoy LE, et al. Reprogramming the antigen specificity of B cells using genome-editing technologies. Kurosaki T, Storz G, Yasuda T, editors. *Elife* [Internet]. 2019;8:e42995. Available from: <https://doi.org/10.7554/eLife.42995>
187. Alshaweesh J, Nakamura R, Tanaka Y, Hayashishita M, Musa A, Kikuchi M, et al. Leishmania major Strain-Dependent Macrophage Activation Contributes to Pathogenicity in the Absence of Lymphocytes. *Microbiol Spectr*. 2022 Oct 26;10(5).
188. Cantrell D. Signaling in lymphocyte activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(6):1–14.
189. Brittingham A, Chen † Gang, Mcgwire BS, Chang KP, Mosser DM. Interaction of Leishmania gp63 with Cellular Receptors for Fibronectin. Vol. 67, *INFECTION AND IMMUNITY*. 1999.
190. Dixit UG, Rodríguez NE, Polando R, McDowell MA, Wilson ME. Complement receptor 3 mediates ruffle-like, actin-rich aggregates during phagocytosis of Leishmania infantum metacyclics. *Exp Parasitol*. 2021 Jan 1;220.
191. Gómez MA, Olivier M. Proteases and phosphatases during leishmania-macrophage interaction: Paving the road for pathogenesis. *Virulence*. 2010;1(4):314–8.
192. Contreras I, Gómez MA, Nguyen O, Shio MT, McMaster RW, Olivier M. Leishmania-Induced Inactivation of the Macrophage Transcription Factor AP-1 Is Mediated by the Parasite Metalloprotease GP63. *PLoS Pathog*. 2010;6(10):e1001148.
193. da Silva Lira Filho A, Fajardo EF, Chang KP, Clément P, Olivier M. Leishmania Exosomes/Extracellular Vesicles Containing GP63 Are Essential for Enhance Cutaneous Leishmaniasis Development Upon Co-Inoculation of Leishmania amazonensis and Its Exosomes. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Feb 3;11.
194. Reichenbach P, Giordano Attianese GMP, Ouchen K, Cribioli E, Triboulet M, Ash S, et al. A lentiviral vector for the production of T cells with an inducible transgene and a constitutively expressed tumour-targeting receptor. *Nat Biomed Eng*. 2023 Sep 1;7(9):1063–80.
195. Lieke T, Nylén S, Eidsmo L, McMaster WR, Mohammadi AM, Khamesipour A, et al. Leishmania surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. *Clin Exp Immunol*. 2008;153(2):221–30.
196. Cecílio P, Pérez-Cabezas B, Santarém N, Maciel J, Rodrigues V, da Silva AC. Deception and manipulation: The arms of Leishmania, a successful parasite. Vol. 5, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2014.

197. Mukherjee P, Sen PC, Ghose AC. Lymph node cells from BALB/c mice with chronic visceral leishmaniasis exhibiting cellular anergy and apoptosis: Involvement of Ser/Thr phosphatase. *Apoptosis*. 2006 Nov;11(11):2013–29.
198. Corradin S, Mauë J, Ransijn A, Stü Rzinger ¶ C, Vergè G. Down-regulation of MARCKS-related Protein (MRP) in Macrophages Infected with Leishmania* [Internet]. 1999. Available from: <http://www.jbc.org>
199. Khiem D, Cyster JG, Schwarz JJ, Black BL. A p38 MAPK-MEF2C pathway regulates B-cell proliferation [Internet]. 2008. Available from: www.pnas.org/cgi/content/full/
200. Ogawa S, Lozach J, Benner C, Pascual G, Tangirala RK, Westin S, et al. Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. *Cell*. 2005;122(5):707–21.
201. Tuon FF, Amato VS, Bacha HA, AlMusawi T, Duarte MI, Neto VA. Toll-like receptors and leishmaniasis. *Infect Immun*. 2008;76(3):866–72.
202. Das S, Rani M, Rabidas V, Pandey K, Sahoo GC, Das P. TLR9 and MyD88 are crucial for the maturation and activation of dendritic cells by paromomycin-miltefosine combination therapy in visceral leishmaniasis. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2014;171(5):1260–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24670148>
203. Srivastava S, Pandey SP, Jha MK, Chandel HS, Saha B. Leishmania expressed lipophosphoglycan interacts with Toll-like receptor (TLR)-2 to decrease TLR-9 expression and reduce anti-leishmanial responses. *Clin Exp Immunol*. 2013 Jun;172(3):403–9.
204. Urzainqui A, Serrador JM, Viedma F, Yáñez-Mó M, Rodríguez A, Corbí AL, et al. ITAM-based interaction of ERM proteins with Syk mediates signaling by the leukocyte adhesion receptor PSGL-1. *Immunity*. 2002;17(4):401–12.
205. Turner M, Gulbranson-Judge A, Quinn ME, Walters AE, MacLennan ICM, Tybulewicz VLJ. Syk Tyrosine Kinase Is Required for the Positive Selection of Immature B Cells into the Recirculating B Cell Pool. *J Exp Med*. 2002;186(12):2013–21.
206. Falet H, Pollitt AY, Begonja AJ, Weber SE, Duerschmied D, Wagner DD, et al. A novel interaction between FlnA and Syk regulates platelet ITAM-mediated receptor signaling and function. *J Exp Med*. 2010;207(9):1967–79.
207. Schweighoffer E, Nys J, Vanes L, Smithers N, Tybulewicz VLJ. TLR4 signals in B lymphocytes are transduced via the B cell antigen receptor and SYK. *Journal of Experimental Medicine*. 2017 May 1;214(5):1269–80.
208. Halliley JL, Tipton CM, Liesveld J, Rosenberg AF, Darce J, Gregoret IV, et al. Long-Lived Plasma Cells Are Contained within the CD19 CD38 CD138 Subset in Human Bone Marrow.

- Immunity [Internet]. 2015 Jul 21;43(1):132–45. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.016>
209. Chen L, Diao L, Yang Y, Yi X, Rodriguez BL, Li Y, et al. CD38-mediated immunosuppression as a mechanism of tumor cell escape from PD-1/PD-l1 blockade. *Cancer Discov.* 2018 Sep 1;8(9):1156–75.
 210. Piedra-Quintero ZL, Wilson Z, Nava P, Guerau-de-Arellano M. CD38: An Immunomodulatory Molecule in Inflammation and Autoimmunity. Vol. 11, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
 211. Hogan KA, Chini CCS, Chini EN. The Multi-faceted Ecto-enzyme CD38: Roles in immunomodulation, cancer, aging, and metabolic diseases. Vol. 10, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2019.
 212. Nair AG, Leon-Ponte M, Kim VHD, Sussman G, Ehrhardt GRA, Grunebaum E. Characterizing CD38 expression in terminally differentiated B cells using variable lymphocyte receptor B tetramers. *Front Immunol.* 2024;15.
 213. Chini CCS, Peclat TR, Warner GM, Kashyap S, Espindola-Netto JM, de Oliveira GC, et al. CD38 ecto-enzyme in immune cells is induced during aging and regulates NAD⁺ and NMN levels. *Nat Metab* [Internet]. 2020;2(11):1284–304. Available from: <https://doi.org/10.1038/s42255-020-00298-z>
 214. Zeng F, Zhang J, Jin X, Liao Q, Chen Z, Luo G, et al. Effect of CD38 on B-cell function and its role in the diagnosis and treatment of B-cell-related diseases. Vol. 237, *Journal of Cellular Physiology*. John Wiley and Sons Inc; 2022. p. 2796–807.
 215. Isabelle C, Boles A, McConnell K, Keller R, Burzinski R, Hutchins Z, et al. CD38 in the pathobiology of cutaneous T-cell lymphoma and the potential for combination therapeutic intervention. *Leukemia* [Internet]. 2025;39(5):1146–56. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41375-025-02551-4>
 216. Xie G, Chen X, Gao Y, Yang M, Zhou S, Lu L, et al. Age-Associated B Cells in Autoimmune Diseases: Pathogenesis and Clinical Implications. Vol. 68, *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. Springer; 2025.
 217. Qian T, Hong J, Wang L, Wang Z, Lu Z, Li Y, et al. Regulation of CD11b by HIF-1 α and the STAT3 signaling pathway contributes to the immunosuppressive function of B cells in inflammatory bowel disease. *Mol Immunol.* 2019 Jul 1;111:162–71.
 218. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function. Vol. 42, *Immunity*. Cell Press; 2015. p. 607–12.

219. Gao P, Adachi T, Okai S, Morita N, Kitamura D, Shinkura R. Integrin CD11b provides a new marker of pre-germinal center IgA+B cells in murine Peyer's patches. *Int Immunol*. 2022 May 1;34(5):249–61.
220. Shang J, Zha H, Sun Y. Phenotypes, Functions, and Clinical Relevance of Regulatory B Cells in Cancer. Vol. 11, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
221. Berthelot JM, Jamin C, Amrouche K, Le Goff B, Maugars Y, Youinou P. Regulatory B cells play a key role in immune system balance. Vol. 80, *Joint Bone Spine*. 2013. p. 18–22.
222. Kyewski B, Klein L. A central role for central tolerance. Vol. 24, *Annual Review of Immunology*. 2006. p. 571–606.
223. Chan A, Ayala JM, Alvarez F, Piccirillo C, Dong G, Langlais D, et al. The role of Leishmania GP63 in the modulation of innate inflammatory response to Leishmania major infection. *PLoS One*. 2021 Dec 1;16(12 December).
224. Silva LP, Paciello MO, Aviz Teixeira WP, Rivas AV, Agular RWS, Cangussu ASR, et al. Immunogenicity of HLA-DR1 and HLA-A2 peptides derived from Leishmania major Gp63 in golden hamsters. *Parasite Immunol*. 2020 Dec 1;42(12).
225. Alhabbab RY, Nova-Lamperti E, Aravena O, Burton HM, Lechler RI, Dorling A, et al. Regulatory B cells: Development, phenotypes, functions, and role in transplantation. Vol. 292, *Immunological Reviews*. Blackwell Publishing Ltd; 2019. p. 164–79.
226. Le Roux D, Lankar D, Yuseff MI, Vascotto F, Yokozeki T, Faure-André G, et al. Syk-dependent Actin Dynamics Regulate Endocytic Trafficking and Processing of Antigens Internalized through the B-Cell Receptor □ D □ V. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2007;18:3451–62. Available from: <http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E06>
227. Uckun FM, Qazi S, Ma H, Tuel-Ahlgren L, Ozer Z. STAT3 is a substrate of SYK tyrosine kinase in B-lineage leukemia/lymphoma cells exposed to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Feb 16;107(7):2902–7.
228. Domínguez-Ramírez L, Anaya-Ruiz M, Cortés-Hernández P. Quality over quantity: how to get the best results when using docking for repurposing. *Frontiers in Bioinformatics*. 2025;5.
229. Dvorkin S, Cambier S, Volkman HE, Stetson DB. New frontiers in the cGAS-STING intracellular DNA-sensing pathway. Vol. 57, *Immunity*. Cell Press; 2024. p. 718–30.
230. Sun Y, Cheng Y. STING or Sting: cGAS-STING-Mediated Immune Response to Protozoan Parasites. *Trends Parasitol* [Internet]. 2020 Sep 1;36(9):773–84. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.07.001>

231. Mukherjee B, Mukhopadhyay R, Bannerjee B, Chowdhury S, Mukherjee S. Antimony-resistant but not antimony-sensitive *Leishmania donovani* up-regulates host IL-10 to overexpress multidrug-resistant protein 1. 2013;110(7).
232. Rolle L, Memarzadeh Tehran M, Morell-García A, Raeva Y, Schumacher A, Hartig R, et al. Cutting Edge: IL-10-Producing Regulatory B Cells in Early Human Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2013;70(6):448–53.
233. Goto H, Lindoso J a L. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2004;37(4):615–23.
234. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2011;9(8):604–15. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro2608>
235. Pollock KGJ, Mcneil KS, Jeremy C, Lyons RE, Brewer JM, Scott P, et al. The *Leishmania mexicana* Cysteine Protease, CPB2.8, Induces Potent Th2 Responses. 2015;
236. Lecoeur H, Prina E, Rosazza T, Kokou K, N'Diaye P, Aulner N, et al. Targeting Macrophage Histone H3 Modification as a *Leishmania* Strategy to Dampen the NF-κB/NLRP3-Mediated Inflammatory Response. *Cell Rep*. 2020 Feb 11;30(6):1870-1882.e4.
237. Yorek MS, Poudel B, Mazgaeen L, Pope RM, Wilson ME, Gurung P. *Leishmania* major degrades murine CXCL1 – An immune evasion strategy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019 Jul 1;13(7).
238. Lecoeur H, Rosazza T, Kokou K, Varet H, Coppée JY, Lari A, et al. *Leishmania amazonensis* Subverts the Transcription Factor Landscape in Dendritic Cells to Avoid Inflammasome Activation and Stall Maturation. *Front Immunol*. 2020 Jun 9;11.
239. Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol*. 2002;72(2):132–41.

11. ANEXOS

ANEXO 1 Análisis de secuencias de GP63 en las diferentes especies de Leishmania reportadas en la base de datos TryptripBD.

Región catalítica de GP63 en diferentes especies

✓ 1. L1ML:APDRID:CHAINSEQUENCE
✓ 2. LAEL147 000487400 Leishmania aethiopica L147 major surface protease gp63 putative protein length=566
✓ 3. LARLEM1108 280011300 Leishmania arabica strain LEM1108 major surface protease gp63 putative protein length=247
✓ 4. LBRM2903 100010500 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2903 major surface protease gp63 putative protein length=577
✓ 5. LBRM2903 100010600 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2903 major surface protease gp63 putative protein length=578
✓ 6. LBRM2903 100011100 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2903 major surface protease gp63 putative protein length=478
✓ 7. LBRM2903 100011400 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2903 major surface protease gp63 putative protein length=362
✓ 8. LBRM2903 100012500 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2903 major surface protease gp63 putative protein length=446
✓ 9. LBRM2903 100012600 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2903 major surface protease gp63 putative protein length=363
✓ 10. LBRM2903 100013000 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2903 major surface protease gp63 putative protein length=333
✓ 11. LBRM2903 100013100 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2903 major surface protease gp63 putative protein length=383
✓ 12. LBRM2903 100013200 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2903 major surface protease gp63 putative protein length=344
✓ 13. LBRM2903 100013300 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2903 major surface protease gp63 putative protein length=405
✓ 14. LBRM2903 000006200 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2903 major surface protease gp63 putative protein length=478
✓ 15. LBRM2903 000007400 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2903 major surface protease gp63 putative protein length=478
✓ 16. LBRM2903 000008600 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2903 major surface protease gp63 putative protein length=363
✓ 17. LBRM2903 000008900 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2903 major surface protease gp63 putative protein length=584
✓ 18. LBRM2903 000009800 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2903 major surface protease gp63 putative protein length=584
✓ 19. LbrM.10.1550 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 GP63 leishmanolysin (fragment) protein length=559
✓ 20. LbrM.10.1560 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 GP63 leishmanolysin (fragment) protein length=340
✓ 21. LbrM.10.1570 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 GP63 leishmanolysin (fragment) protein length=584
✓ 22. LbrM.10.1580 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 GP63 leishmanolysin (fragment) protein length=567
✓ 23. LbrM.10.1590 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 GP63 leishmanolysin (fragment) protein length=707
✓ 24. LbrM.10.1610 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 GP63 leishmanolysin (fragment) protein length=584
✓ 25. LbrM.10.1620 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 GP63 leishmanolysin (fragment) protein length=584
✓ 26. LbrM.10.1630 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 GP63 leishmanolysin (fragment) protein length=584
✓ 27. LbrM.10.1640 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 GP63 leishmanolysin (fragment) protein length=711
✓ 28. LbrM.10.1650 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 GP63 leishmanolysin (fragment) protein length=584
✓ 29. LbrM.10.1660 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 GP63 leishmanolysin (fragment) protein length=577
✓ 30. LbrM.10.1670 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 GP63 leishmanolysin (fragment) protein length=574
✓ 31. LbrM.10.1680 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 GP63 leishmanolysin (fragment) protein length=401
✓ 32. LbrM.10.1690 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 GP63 leishmanolysin (fragment) protein length=511
✓ 33. LbrM.10.1710 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 GP63 leishmanolysin (fragment) protein length=305
✓ 34. LbrM.10.0470 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 GP63 leishmanolysin (fragment) protein length=577
✓ 35. LbrM.10.0480 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 metallopeptidase Clan MA(M) Family M8 protein length=584
✓ 36. LbrM.10.0500 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 metallopeptidase Clan MA(M) Family M8 protein length=385
✓ 37. LbrM.10.0510 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 metallopeptidase Clan MA(M) Family M8 protein length=622
✓ 38. LbrM.10.0520 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 metallopeptidase Clan MA(M) Family M8 protein length=575
✓ 39. LbrM.10.0530 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 metallopeptidase Clan MA(M) Family M8 protein length=501
✓ 40. LbrM.10.0540 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 metallopeptidase Clan MA(M) Family M8 protein length=557
✓ 41. LbrM.10.0550 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 metallopeptidase Clan MA(M) Family M8 (fragment) protein length=615
✓ 42. LbrM.10.0560 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 metallopeptidase Clan MA(M) Family M8 protein length=623
✓ 43. LbrM.10.0570 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 metallopeptidase Clan MA(M) Family M8 protein length=450
✓ 44. LbrM.10.0580 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 metallopeptidase Clan MA(M) Family M8 protein length=622
✓ 45. LbrM.10.0590 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 GP63 leishmanolysin (fragment) protein length=589
✓ 46. LbrM.10.0600 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 GP63 leishmanolysin (fragment) protein length=611
✓ 47. LbrM.10.0610 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 GP63 leishmanolysin (fragment) protein length=621

L	V	T	R	V	T	H	E	M	A	H	A	L	G	F	S	G	P	F	F	E	D	A	R	I	V	A	N	V	P	N	V	R	G	K	N	F	D	V	P	V	I	N	S	S	T	A	V	-
-	T	V	R	V	T	H	E	V	L	H	A	L	G	F	T	R	S	V	F	Q	E	R	N	M	L	A	M	A	S	F	R	G	K	S	P	-	-	S	P	V	I	R	S	E	K	V	-	
-	T	V	R	V	T	H	E	V	L	H	A	L	G	F	S	R	S	V	F	Q	E	R	N	M	L	A	M	A	S	F	R	I	K	R	P	-	-	S	P	V	I	R	S	E	K	V	-	
I	M	I	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	D	L	T	A	F	D	A	L	K	L	I	Q	D	V	K	D	L	R	G	K	D	F	E	V	P	V	L	S	S	P	T	V	-
L	M	I	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	N	R	I	F	F	D	S	F	G	M	V	T	A	A	I	G	I	R	G	K	D	F	E	V	P	V	L	N	T	P	T	V	-
G	T	T	R	T	V	T	H	E	M	A	H	A	L	G	F	D	L	T	L	F	E	E	S	D	L	D	V	K	D	L	R	G	K	D	F	E	V	P	V	L	S	S	P	T	V	-		
F	M	L	R	S	V	T	H	E	M	A	H	A	L	G	F	D	L	T	L	F	E	E	L	D	L	D	V	V	S	N	L	R	G	K	D	F	E	V	P	V	L	N	S	P	T	V	-	
I	M	V	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	D	L	T	A	F	D	A	L	E	L	I	H	E	V	S	N	L	R	E	R	D	F	E	V	P	V	L	N	T	P	T	V	-
I	M	V	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	D	L	T	A	F	D	A	L	E	L	I	H	E	V	S	N	L	R	E	R	D	F	E	V	P	V	L	N	T	P	T	V	-
I	M	V	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	D	L	T	A	F	D	A	L	E	L	I	H	E	V	S	N	L	R	E	R	D	F	E	V	P	V	L	N	T	P	T	V	-
L	M	I	R	T	V	T	H	E	I	A	H	A	L	G	F	D	L	T	I	F	E	E	M	E	I	D	E	V	N	N	L	R	G	R	D	F	E	V	P	V	N	T	P	T	V	-		
L	M	I	R	T	V	T	H	E	I	A	H	A	L	G	F	D	L	T	I	F	E	E	M	E	I	D	E	V	N	N	L	R	G	R	D	F	E	V	P	V	N	T	P	T	V	-		
T	M	V	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	D	L	T	V	F	E	E	L	L	I	Q	D	V	K	D	L	R	G	K	D	F	E	V	P	V	L	S	S	P	T	V	-	
L	M	V	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	D	L	T	L	F	D	E	L	E	L	I	Q	D	V	K	D	L	R	G	K	D	F	E	V	P	V	L	S	S	P	T	V	-
G	T	T	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	S	S	V	F	F	E	S	T	G	I	V	M	S	V	T	N	L	R	G	K	P	F	A	A	P	V	I	N	S	S	T	V	-
G	T	T	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	S	S	V	F	F	E	G	T	G	I	V	K	S	V	T	N	L	R	G	K	P	F	A	A	P	V	I	N	S	S	T	V	-
L	M	V	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	D	L	T	L	F	D	E	L	E	L	I	D	E	V	N	N	L	R	G	K	D	F	E	V	P	V	L	S	S	P	T	V	-
I	M	V	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	N	R	I	F	F	D	S	F	G	M	V	T	A	A	I	G	I	R	G	K	D	F	E	V	P	V	L	N	T	P	T	V	-
G	T	T	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	D	L	T	A	F	D	A	L	E	L	I	H	D	V	K	D	L	R	E	R	N	F	E	V	P	V	L	S	S	P	T	V	-
I	M	V	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	D	L	T	A	F	D	A	L	E	L	I	H	D	V	K	D	L	R	E	R	N	F	E	V	P	V	L	S	S	P	T	V	-
I	M	V	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	D	L	T	A	F	D	A	L	E	L	I	H	E	V	S	N	L	R	E	R	D	F	E	V	P	V	L	N	T	P	T	V	-
L	M	I	R	T	V	T	H	E	I	A	H	A	L	G	F	D	L	T	I	F	E	E	M	E	I	D	E	V	N	N	L	R	G	R	D	F	E	V	P	V	N	T	P	T	V	-		
L	M	I	R	T	V	T	H	E	I	A	H	A	L	G	F	D	L	T	I	F	E	E	M	E	I	D	E	V	N	N	L	R	G	R	D	F	E	V	P	V	N	T	P	T	V	-		
T	M	V	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	D	L	T	V	F	E	E	L	L	I	Q	D	V	K	D	L	R	G	K	D	F	E	V	P	V	L	S	S	P	T	V	-	
L	M	V	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	D	L	T	L	F	D	E	L	E	L	I	Q	D	V	K	D	L	R	G	K	D	F	E	V	P	V	L	S	S	P	T	V	-
G	T	T	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	S	S	V	F	F	E	S	T	G	I	V	M	S	V	T	N	L	R	G	K	P	F	A	A	P	V	I	N	S	S	T	V	-
G	T	T	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	S	S	V	F	F	E	G	T	G	I	V	K	S	V	T	N	L	R	G	K	P	F	A	A	P	V	I	N	S	S	T	V	-
L	M	V	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	D	L	T	L	F	D	E	L	E	L	I	D	E	V	N	N	L	R	G	K	D	F	E	V	P	V	L	S	S	P	T	V	-
I	M	V	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	N	R	I	F	F	D	S	F	G	M	V	T	A	A	I	G	I	R	G	K	D	F	E	V	P	V	L	N	T	P	T	V	-
G	T	T	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	D	L	T	A	F	D	A	L	E	L	I	H	D	V	K	D	L	R	E	R	N	F	E	V	P	V	L	S	S	P	T	V	-
I	M	V	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	D	L	T	A	F	D	A	L	E	L	I	H	D	V	K	D	L	R	E	R	N	F	E	V	P	V	L	S	S	P	T	V	-
I	M	V	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	D	L	T	A	F	D	A	L	E	L	I	H	E	V	S	N	L	R	E	R	D	F	E	V	P	V	L	N	T	P	T	V	-
L	M	I	R	T	V	T	H	E	I	A	H	A	L	G	F	D	L	T	I	F	E	E	M	E	I	D	E	V	N	N	L	R	G	R	D	F	E	V	P	V	N	T	P	T	V	-		
L	M	I	R	T	V	T	H	E	I	A	H	A	L	G	F	D	L	T	I	F	E	E	M	E	I	D	E	V	N	N	L	R	G	R	D	F	E	V	P	V	N	T	P	T	V	-		
T	M	V	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	D	L	T	V	F	E	E	L	L	I	Q	D	V	K	D	L	R	G	K	D	F	E	V	P	V	L	S	S	P	T	V	-	
L	M	V	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	D	L	T	L	F	D	E	L	E	L	I	Q	D	V	K	D	L	R	G	K	D	F	E	V	P	V	L	S	S	P	T	V	-
G	T	T	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	S	S	V	F	F	E	S	T	G	I	V	M	S	V	T	N	L	R	G	K	P	F	A	A	P	V	I	N	S	S	T	V	-
G	T	T	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	S	S	V	F	F	E	G	T	G	I	V	K	S	V	T	N	L	R	G	K	P	F	A	A	P	V	I	N	S	S	T	V	-
L	M	V	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	D	L	T	L	F	D	E	L	E	L	I	D	E	V	N	N	L	R	G	K	D	F	E	V	P	V	L	S	S	P	T	V	-
I	M	V	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	N	R	I	F	F	D	S	F	G	M	V	T	A	A	I	G	I	R	G	K	D	F	E	V	P	V	L	N	T	P	T	V	-
G	T	T	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	D	L	T	A	F	D	A	L	E	L	I	H	D	V	K	D	L	R	E	R	N	F	E	V	P	V	L	S	S	P	T	V	-
I	M	V	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	D	L	T	A	F	D	A	L	E	L	I	H	D	V	K	D	L	R	E	R	N	F	E	V	P	V	L	S	S	P	T	V	-
I	M	V	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	D	L	T	A	F	D	A	L	E	L	I	H	E	V	S	N	L	R	E	R	D	F	E	V	P	V	L	N	T	P	T	V	-
L	M	I	R	T	V	T	H	E	I	A	H	A	L	G	F	D	L	T	I	F	E	E	M	E	I	D	E	V	N	N	L	R	G	R	D	F	E	V	P	V	N	T	P	T	V	-		
L	M	I	R	T	V	T	H	E	I	A	H	A	L	G	F	D	L	T	I	F	E	E	M	E	I	D	E	V	N	N	L	R	G	R	D	F	E	V	P	V	N	T	P	T	V	-		
T	M	V	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	D	L	T	V	F	E	E	L	L	I	Q	D	V	K	D	L	R	G	K	D	F	E	V	P	V	L	S	S	P	T	V	-	
L	M	V	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	D	L	T	L	F	D	E	L	E	L	I	Q	D	V	K	D	L	R	G	K	D	F	E	V	P	V	L	S	S	P	T	V	-
G	T	T	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	S	S	V	F	F	E	S	T	G	I	V	M	S	V	T	N	L	R	G	K	P	F	A	A	P	V	I	N	S	S	T	V	-
G	T	T	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	S	S	V	F	F	E	G	T	G	I	V	K	S	V	T	N	L	R	G	K	P	F	A	A	P	V	I	N	S	S	T	V	-
L	M	V	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	D	L	T	L	F	D	E	L	E	L	I	D	E	V	N	N	L	R	G	K	D	F	E	V	P	V	L	S	S	P	T	V	-
I	M	V	R	T	V	T	H	E																																								

✓47. LbrM.10.0610 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 GP63 leishmanolysin protein length=621	G T T R T V T H E V A H A L G F S S	F F E N A G I V M N V T N L R G K P F A A P V I N S S T V V -
✓48. LbrM.31.2260 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 metallo-peptidase Clan MA(M) Family M8 protein length=648(2)	G L R R A A A H E L L H A L G F T S	V F K A R G M F A T V P S L R G K K N V P V L N S S A V R A A
✓49. LbrM.31.2260 Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 metallo-peptidase Clan MA(M) Family M8 protein length=648	G L R R A A A H E L L H A L G F T S	V F K A R G M F A T V P S L R G K K N V P V L N S S A V R A A
✓50. LdBPK 280600.1 Leishmania donovani BPK282A1 major surface protease gp63 putative protein length=566	- T V R V V A H E V L H A L G F T R	V F K Q Q N M L V M A S F R G K S P - - S P V I R S A N V V -
✓51. LdCL 100010100 Leishmania donovani CL-SL GP63 leishmanolysin protein length=598	L V T R V V T H E M A H A L G F S D	F F T D K R M L H N L E K I R G K P H N A P V I H S S T A V -
✓52. LdCL 100010300 Leishmania donovani CL-SL GP63 leishmanolysin protein length=598	L V T R V V T H E M A H A L G F S D	F F T D K R M L H N L E K I R G K P H N A P V I H S S T A V -
✓53. LdCL 100010500 Leishmania donovani CL-SL GP63 leishmanolysin protein length=598	L V T R V V T H E M A H A L G F S D	F F T D K R M L H N L E K I R G K P H N A P V I H S S T A V -
✓54. LdCL 100010700 Leishmania donovani CL-SL GP63 leishmanolysin protein length=598	L V T R V V T H E M A H A L G F S D	F F T D K R M L H N L E K I R G K P H N A P V I H S S T A V -
✓55. LdCL 100010900 Leishmania donovani CL-SL GP63 leishmanolysin protein length=589	L V T R V V T H E M A H A L G F S V	F F E G A R I L E N I S N V R H K K D F D V P V I N S S T A V -
✓56. LdCL 100011000 Leishmania donovani CL-SL GP63 leishmanolysin protein length=599	L V T R V V T H E M A H A L G F S V	F F E G A R I L E N I S N V R H K K D F D V P V I N S S T A V -
✓57. LdCL 100011100 Leishmania donovani CL-SL GP63 leishmanolysin protein length=599	L V T R V V T H E M A H A L G F S V	F F E G A R I L E N I S N V R H K K D F D V P V I N S S T A V -
✓58. LdCL 100011200 Leishmania donovani CL-SL GP63 leishmanolysin protein length=599	L V T R V V T H E M A H A L G F S V	F F E G A R I L E N I S N V R H K K D F D V P V I N S S T A V -
✓59. LdCL 100011300 Leishmania donovani CL-SL GP63 leishmanolysin protein length=641	L V T R V V T H E M A H A L G F S G	F F T E I L L V T Q M M N I R G K D F N V S V I N S S T A V -
✓60. LdCL 100011400 Leishmania donovani CL-SL GP63 leishmanolysin protein length=599	L V T R V V T H E M A H A L G F S V	F F E G A R I L E N I S N V R H K K D F D V P V I N S S T A V -
✓61. LdCL 100011500 Leishmania donovani CL-SL GP63 leishmanolysin protein length=599	L V T R V V T H E M A H A L G F S V	F F F S K Y I T A M V P A G R G R P G S V P V L I S P T A V -
✓62. LdCL 100011600 Leishmania donovani CL-SL GP63 leishmanolysin protein length=599	L V T R V V T H E M A H A L G F S V	F F F S K Y I T A M V P A G R G R P G S V P V L I S P T A V -
✓63. LdCL 100011800 Leishmania donovani CL-SL GP63 leishmanolysin protein length=589	L V T R V V T H E M A H T L G F S V	F F F Q R K G M A A M V A A T R G R P G E M P V L I S P T V V -
✓64. LdCL 280010700 Leishmania donovani CL-SL major surface protease gp63 putative protein length=566	- T V R V V A H E V L H A L G F T R	V F K Q Q N M L V M A S F R G K S P - - S P V I R S A N V V -
✓65. LENLEM3045 010005000 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=429	T M L R S V T H E L T H A L G F T K	F F F S K Y I T A M V P A G R G R P G S V P V L I S P T A V -
✓66. LENLEM3045 030005100 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=497	L K V R L V L H E V A H A L G F S E	F F F Q R K G M A A M V A A T R G R P G E M P V L I S P T V V -
✓67. LENLEM3045 070005000 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=597	L R V R M A V H E L A H A L G F T V	F F K A A H I I G M A P A G R G R P G S V P V L K T P T V V -
✓68. LENLEM3045 080005000 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=584	V K V R M A V H E L A H A L G F T E	S F K D A H I I S M V P A S R G R P G L I P V L K S P T V V -
✓69. LENLEM3045 090005000 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=609	L R L R T A V H E L A H A L G F A D V	F F K E A H I I G T A P A G R G R P G R V P V L I S P T V V -
✓70. LENLEM3045 110005000 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=540	G I T R V A H E M A H A L G F S G	F F N S A G I V Q F V F G V R G K D F A V P V I N T A M V V -
✓71. LENLEM3045 110005100 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=597	Q M V R T V T H E L A H A L G F S Q	F F G R K H I V A M V T A G R G R P G C V P A I I S Q T A V -
✓72. LENLEM3045 120005000 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=610	S K V R A V V H E I A H A L G F S D	S F K A A H I I G T A P A S H G R P G Q V P V L K S P A V V -
✓73. LENLEM3045 120017900 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=610	Q M L R T V T H E L T H A L G F S K	V L E S R G I S A L V A A G R G R T G Q V P V L T S P T V V -
✓74. LENLEM3045 140021800 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=609	Q M L R G V T H E L A H A L G F N T	I F Q R T G I Y A M V T A G R G R S G Q V P A I I S P T A V -
✓75. LENLEM3045 160005000 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=622	S K V R A V V H E I A H A L G F T D	S F K A A H I I D M V P A S R G R P G Y V S V L K S P T V V -
✓76. LENLEM3045 180005000 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=500	L K V R L A V H E I T H S L G F T V	S F K A A R I S G M V P A S R G R L G E I P V L I S P T V V -
✓77. LENLEM3045 200024600 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=608	Y K V R T A V H E M A H A L G F G K	F F R S E G M V A M V S A T R G R P G E M P V L I S P T V M -
✓78. LENLEM3045 210027900 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=497	S K V R T V T H E M A H A L G F T D	F F Q A A H I I D M A P A G R G R P G Q V P V L K S P T V V -
✓79. LENLEM3045 230027400 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=501	Q M L R T V T H E L T H A L G F S D	F F R R K H I I S M V Q V G R G R T G Q V P V L I S P T V V -
✓80. LENLEM3045 260035100 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=610	S N V R I A V H E M T H A L G F T D	F F Q A A H I I D M A P A S R G R L G Q V P V L K S P T V V -
✓81. LENLEM3045 270005000 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=609	K M L R I V T H E L T H G L G F S R	F F G A Q Q I I A M V A A G R G R P G Q V P A I I G P A S V -
✓82. LENLEM3045 280038900 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=500	L K V R T A V H E M A H A L G F T D V	F F K A A H I I G T A P A G R G R P G S V P V L I S P T V V -
✓83. LENLEM3045 320005000 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=458	S K I R I A H E L A H A L G F T V	S F K A A R I I G M A L A G R G R P G R V P V L I S P T V V -
✓84. LENLEM3045 330005000 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=500	L K V R L A L H E I A H A L G F T F	F F Q A A H I I S G M A P A S R G R S G S V P V L I S P T V V -
✓85. LENLEM3045 330043100 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=605	Y R V R T S M H E M A H A L G F S A	F F R D A D M S A M F A T R G R P G E M P V L K S P L V A -
✓86. LENLEM3045 000005300 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=516	Q M L R T V T H E L T H A L G F S H	F F S R A H I Y A M V E A G R G R P G Y V P A I I S P T A V -
✓87. LENLEM3045 000009200 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=610	L M L R T V T H E L A H A L G F T G	F F S T A R I S A M V A A C R G R P G Q V P A I I S P T A V -
✓88. LENLEM3045 000011600 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=606	Q M L R T V T H E M A H A L G F G K	F F L Q K R I A A M V A A G R G R P G H V P A I I S P T A V -
✓89. LENLEM3045 000012400 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=499	L M L R T V L H E T T H A L G F G S	F F Q R K G M T A M V A A T R G R P G S V P V I T S P T A V -
✓90. LENLEM3045 000013000 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=624	L M L R T V L H E T T H A L G F S H	A F Q R K G M T A L V P A T R G R F G L V P V L I S Q T A V -
✓91. LENLEM3045 000013100 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=386	R M R R A V T H E M A H A L G F S E	F L A K A G M F Q T V M A S R D R G I Q V P V I S P I V V -
✓92. LENLEM3045 000015100 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=430	L M L R T V T H E L A H A L G F S Q	F F G K K N I A A M V A A S R G R P G C V P A I I S P T V V -
✓93. LENLEM3045 000016300 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=407	Q M L R I V T H E L T H A L G F S K	S F L R K G M A A M I A A G R G R S G R V P V L K S P T V V -

HEXXHXXGXXH

Análisis realizado en MEGA[X] 2020

✓ 93. LENLEM3045 000016300 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=407	Q	M	L	R	I	T	H	E	L	T	H	A	L	G	F	S	K	S	F	L	R	K	G	M	A	A	M	I	A	A	G	R	G	R	S	G	R	V	P	V	L	K	S	P	T	V	V	-		
✓ 94. LENLEM3045 000019400 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=408	Q	M	L	R	I	T	H	E	L	T	H	A	L	G	F	S	K	K	V	L	Q	S	K	G	I	S	A	M	V	A	A	G	R	G	K	T	G	Q	V	P	A	I	T	S	P	T	A	V	-	
✓ 95. LENLEM3045 000019500 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=430	Q	M	L	R	I	T	H	E	L	T	H	A	L	G	F	S	K	A	S	F	L	G	K	G	M	T	A	M	I	A	A	G	R	G	R	T	G	R	V	P	L	K	S	P	T	V	V	-		
✓ 96. LENLEM3045 000020100 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=609	L	R	V	R	T	V	H	E	L	A	H	A	L	G	F	A	D	R	F	F	K	E	A	H	I	I	G	T	A	P	A	G	R	G	R	P	G	Q	V	P	V	L	I	S	P	T	V	V	-	
✓ 97. LENLEM3045 000020600 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=429	L	M	L	R	T	T	H	E	L	T	H	A	L	G	F	S	K	A	S	L	L	R	K	G	M	A	A	V	A	A	G	R	G	R	I	G	R	I	P	V	L	I	S	P	T	V	V	-		
✓ 98. LENLEM3045 000022200 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=605	L	R	V	R	M	V	H	E	V	A	H	A	L	G	F	T	V	D	S	L	E	A	A	R	I	S	D	M	V	P	A	S	R	G	R	P	G	E	M	P	V	L	V	S	P	T	V	V	-	
✓ 99. LENLEM3045 000026000 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=622	E	M	L	R	S	T	H	E	L	A	H	A	L	G	F	S	K	V	I	F	S	T	A	R	I	S	A	M	V	A	A	G	R	G	R	P	G	L	V	P	A	I	I	S	P	T	A	V	-	
✓ 100. LENLEM3045 000028800 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=609	Q	M	L	R	T	T	H	E	L	T	H	A	L	G	F	S	K	A	S	F	L	G	K	G	M	T	A	M	I	A	A	G	R	G	R	I	G	R	V	P	V	L	I	S	P	T	V	V	-	
✓ 101. LENLEM3045 000034900 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=458	V	K	F	R	M	V	H	E	L	A	H	A	L	G	F	T	D	D	S	F	K	D	A	R	I	I	S	M	V	P	A	S	R	G	R	P	G	L	V	P	V	L	K	S	P	T	V	V	-	
✓ 102. LENLEM3045 000035000 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=610	V	K	V	R	M	V	H	E	L	A	H	A	L	G	F	T	G	D	S	F	K	D	A	R	I	I	S	M	V	P	A	S	R	G	R	P	G	L	V	P	V	L	K	S	P	T	V	V	-	
✓ 103. LENLEM3045 000036100 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=429	V	M	L	R	T	T	H	E	L	T	H	A	L	G	F	S	Q	V	I	F	S	T	A	R	I	S	A	M	V	A	A	G	R	G	R	P	G	L	V	P	A	I	I	S	P	T	A	V	-	
✓ 104. LENLEM3045 000036200 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=610	L	M	L	R	V	T	H	E	L	T	H	A	L	G	F	S	K	R	V	L	E	S	R	G	I	S	A	L	V	A	A	G	R	G	R	P	G	L	I	P	A	I	I	S	P	T	V	V	-	
✓ 105. LENLEM3045 000037300 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=499	V	K	V	R	S	V	H	E	M	A	H	A	L	G	F	N	K	D	F	F	H	T	V	G	M	S	A	I	V	Q	A	T	R	S	R	L	G	G	M	P	V	L	V	S	P	V	S	-		
✓ 106. LENLEM3045 000038100 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=500	L	N	V	R	M	V	H	E	M	A	H	A	L	G	F	T	I	E	C	F	E	A	A	H	I	T	A	M	V	P	A	S	R	G	R	P	G	E	I	P	V	L	I	S	P	T	A	V	-	
✓ 107. LENLEM3045 000038200 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=456	Q	M	L	R	T	T	H	E	L	A	H	A	L	G	F	S	K	R	F	L	G	K	G	M	T	A	M	I	A	A	G	R	G	R	P	G	H	V	P	A	I	I	S	P	T	V	V	-		
✓ 108. LENLEM3045 000038300 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=487	L	M	V	R	M	V	H	E	M	A	H	A	L	G	F	T	I	E	F	G	E	M	P	V	L	I	S	P	T	A	V	-																		
✓ 109. LENLEM3045 000038800 Leishmania enriettii strain LEM3045 major surface protease gp63 putative protein length=608	S	N	V	R	T	V	H	E	M	A	H	A	L	G	F	T	D	D	F	G	L	V	P	L	K	S	P	T	V	V	-																			
✓ 110. LGELEM452 280011700 Leishmania gerbilli strain LEM452 major surface protease gp63 putative protein length=566	-	T	V	R	V	A	H	E	V	L	H	A	L	G	F	S	R	S	V	-	S	P	I	R	S	E	K	V	V	-																				
✓ 111. LINF 100010100 Leishmania infantum JPCM5 GP63 - leishmanolysin protein length=598	L	V	T	R	V	T	H	E	M	A	H	A	L	G	F	S	D	T	F	F	T	D	K	R	M	L	H	N	V	G	K	I	R	G	K	P	H	N	A	P	V	I	N	S	T	A	V	-		
✓ 112. LINF 100010200 Leishmania infantum JPCM5 GP63 - leishmanolysin protein length=599	L	V	T	R	V	T	H	E	M	A	H	A	L	G	F	S	V	G	F	F	E	G	A	R	I	L	E	S	I	S	N	V	R	H	K	D	F	D	V	P	V	I	N	S	T	A	V	-		
✓ 113. LINF 100010300 Leishmania infantum JPCM5 GP63 - leishmanolysin protein length=599	L	V	T	R	V	T	H	E	M	A	H	A	L	G	F	S	V	G	F	F	E	G	A	R	I	L	E	S	I	S	N	V	R	H	K	D	F	D	V	P	V	I	N	S	T	A	V	-		
✓ 114. LINF 100010400 Leishmania infantum JPCM5 GP63 - leishmanolysin protein length=407	L	V	T	R	V	T	H	E	M	A	H	A	L	G	F	S	V	G	F	F	E	G	A	R	I	L	E	S	I	S	N	V	R	H	K	D	F	D	V	P	V	I	N	S	T	A	V	-		
✓ 115. LINF 100010600 Leishmania infantum JPCM5 GP63 - leishmanolysin protein length=599	L	V	T	R	V	T	H	E	M	A	H	A	L	G	F	S	V	G	F	F	E	G	A	R	I	L	E	S	I	S	N	V	R	H	K	D	F	D	V	P	V	I	N	S	T	A	V	-		
✓ 116. LINF 100010700 Leishmania infantum JPCM5 GP63 - leishmanolysin protein length=599	L	V	T	R	V	T	H	E	M	A	H	A	L	G	F	S	V	G	F	F	E	G	A	R	I	L	E	S	I	S	N	V	R	H	K	D	F	D	V	P	V	I	N	S	T	A	V	-		
✓ 117. LINF 100010800 Leishmania infantum JPCM5 GP63 - leishmanolysin protein length=599	L	V	T	R	V	T	H	E	M	A	H	A	L	G	F	S	V	G	F	F	E	G	A	R	I	L	E	S	I	S	N	V	R	H	K	D	F	D	V	P	V	I	N	S	T	A	V	-		
✓ 118. LINF 100010900 Leishmania infantum JPCM5 GP63 - leishmanolysin protein length=599	L	V	T	R	V	T	H	E	M	A	H	A	L	G	F	S	V	G	F	F	E	G	A	R	I	L	E	S	I	S	N	V	R	H	K	D	F	D	V	P	V	I	N	S	T	A	V	-		
✓ 119. LINF 100011000 Leishmania infantum JPCM5 GP63 - leishmanolysin protein length=599	L	V	T	R	V	T	H	E	M	A	H	A	L	G	F	S	V	G	F	F	E	G	A	R	I	L	E	S	I	S	N	V	R	H	K	D	F	D	V	P	V	I	N	S	T	A	V	-		
✓ 120. LINF 100011100 Leishmania infantum JPCM5 GP63 - leishmanolysin protein length=599	L	V	T	R	V	T	H	E	M	A	H	A	L	G	F	S	V	G	F	F	E	G	A	R	I	L	E	S	I	S	N	V	R	H	K	D	F	D	V	P	V	I	N	S	T	A	V	-		
✓ 121. LINF 100011200 Leishmania infantum JPCM5 GP63 - leishmanolysin protein length=641	L	V	T	R	V	T	H	E	M	A	H	A	L	G	F	S	G	T	F	F	T	E	I	L	L	V	T	Q	M	M	N	I	R	G	K	D	F	N	V	S	V	I	N	S	T	A	V	-		
✓ 122. LINF 100011300 Leishmania infantum JPCM5 GP63 - leishmanolysin protein length=599	L	V	T	R	V	T	H	E	M	A	H	T	L	G	F	S	T	R	V	F	F	Q	D	A	S	I	M	H	Q	V	S	N	I	R	K	T	S	K	V	P	V	L	K	S	R	T	A	V	-	
✓ 123. LINF 280010700 Leishmania infantum JPCM5 major surface protease gp63 - putative protein length=566	-	T	V	R	V	A	H	E	V	L	H	A	L	G	F	T	R	S	V	F	K	Q	Q	N	M	L	V	M	A	S	F	R	G	K	S	P	-	-	S	P	V	I	R	S	A	N	V	-		
✓ 124. LINF 280010800 Leishmania infantum JPCM5 major surface protease gp63 - putative protein length=566	-	T	V	R	V	A	H	E	V	L	H	A	L	G	F	T	R	S	V	F	K	Q	Q	N	M	L	V	M	A	S	F	R	G	K	S	P	-	-	S	P	V	I	R	S	A	N	V	-		
✓ 125. LmjF.10.0460 Leishmania major strain Friedlin GP63 leishmanolysin protein length=602	L	V	T	R	V	T	H	E	M	A	H	A	L	G	F	S	G	F	F	F	K	D	A	R	I	V	A	S	V	P	N	V	R	G	K	N	F	D	V	P	V	I	N	S	T	A	V	-		
✓ 126. LmjF.10.0465 Leishmania major strain Friedlin GP63 leishmanolysin protein length=602	L	V	T	R	V	T	H	E	M	A	H	A	L	G	F	S	G	F	F	E	D	A	R	I	V	A	S	V	P	N	V	R	G	K	N	F	D	V	P	V	I	N	S	T	A	V	-			
✓ 127. LmjF.10.0470 Leishmania major strain Friedlin GP63 leishmanolysin protein length=644	L	V	T	R	V	T	H	E	M	A	H	A	L	G	F	S	G	F	F	E	D	A	R	I	V	A	N	V	S	N	V	R	G	K	N	F	D	V	P	V	I	N	S	T	A	V	-			
✓ 128. LmjF.10.0480 Leishmania major strain Friedlin GP63 leishmanolysin protein length=602	L	V	T	R	V	T	H	E	M	A	H	A	L	G	F	S	G	F	F	E	D	A	R	I	V	A	S	V	P	N	V	R	G	K	N	F	D	V	P	V	I	N	S	T	A	V	-			
✓ 129. LmjF.28.0570 Leishmania major strain Friedlin major surface protease gp63 putative protein length=566	-	T	V	R	V	A	H	E	V	L	H	A	L	G	F	S	R	S	V	F	Q	E	R	N	M	L	A	M	A	S	F	R	S	K	G	P	-	-	S	P	V	I	C	S	E	K	V	-		
✓ 130. LmjF.31.2000 Leishmania major strain Friedlin GP63-like protein leishmanolysin-like protein protein length=636	R	L	R	R	V	S	H	E	L	L	H	A	L	G	F	T	S	S	V	F	K	A	R	G	M	F	A	T	V	P	S	L	R	G	K	R	N	V	P	V	L	N	S	S	A	V	R	A	A	-
✓ 131. LMJLV39 100010200 Leishmania major strain LV39c5 major surface protease gp63 putative protein length=601	L	V	T	R	V	T	H	E	M	A	H	A	L	G	F	S	S	L	F	F	K	D	A	R	I	V	A	S	V	P	N	V	R	G	K	N	F	D	V	P	V	I	N	S	T	A	V	-		
✓ 132. LMJLV39 100010300 Leishmania major strain LV39c5 major surface protease gp63 putative protein length=643	L	V	T	R	V	T	H	E	M	A	H	A	L	G	F	S	G	F	F	E	D	A	R	I	V	A	S	V	P	N	V	R	G	K	N	F	D	V	P	V	I	N	S	T	A	V	-			
✓ 133. LMJLV39 280011300 Leishmania major strain LV39c5 major surface protease gp63 putative protein length=566	-	T	V	R	V	A	H	E	V	L	H	A	L	G	F	S	R	S	V	F	Q	E	R	N	M	L	A	M	A	S	F	R	S	K	G	P	-	-	S	P	V	I	C	S	E	K	V	-		
✓ 134. LMJSD75 100010300 Leishmania major strain SD 75.1 major surface protease gp63 putative protein length=398	L	V	T	R	V	T	H	E	M	A	H	A	L	G	F	S	G	F	F	E	D	A	R	I	V	A	S	V	P	N	V	R	G	K	N	F	D	V	P	V	I	N	S	T						

✓ 140. LmxM.10.0465 Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103 GP63 leishmanolysin protein length=646	L	V	T	R	V	T	H	E	M	A	H	A	L	G	F	S	D	T	F	F	E	A	V	G	I	V	Q	E	V	P	H	V	R	G	K	D	F	N	V	S	V	I	T	S	S	T	V	-		
✓ 141. LmxM.10.0470 Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103 GP63 leishmanolysin protein length=602	L	V	T	R	V	T	A	H	E	M	A	H	A	L	G	F	S	G	T	F	F	E	A	V	G	I	V	Q	E	V	P	G	I	R	G	K	T	F	T	V	A	V	I	N	S	S	T	A	V	-
✓ 142. LmxM.28.0570 Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103 major surface protease gp63 putative protein length=566	-	I	V	R	V	I	A	H	E	V	L	H	A	L	G	F	T	H	S	V	F	K	E	Q	N	M	L	V	M	A	S	F	R	G	K	S	P	-	-	S	P	V	I	R	S	E	K	V	-	
✓ 143. LPAL13 100009700 Leishmania panamensis MHOM/COL/81/L13 major surface protease gp63 putative protein length=329	F	M	V	R	T	V	T	H	E	I	T	H	A	L	G	F	D	L	T	V	F	E	D	M	E	I	V	G	D	V	N	N	L	R	G	R	N	Y	D	V	P	V	L	N	S	P	T	V	M	-
✓ 144. LPAL13 100009800 Leishmania panamensis MHOM/COL/81/L13 major surface protease gp63 putative protein length=450	G	A	T	R	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	S	S	T	F	F	K	S	A	G	I	V	K	S	V	T	N	L	R	G	K	P	F	A	A	P	V	I	N	S	S	T	V	-		
✓ 145. LPAL13 100010100 Leishmania panamensis MHOM/COL/81/L13 major surface protease gp63 putative protein length=329	-	M	T	R	T	V	T	H	E	I	T	H	A	L	G	F	D	L	T	V	F	E	D	M	E	I	V	G	D	V	N	N	L	R	G	R	N	Y	D	V	P	V	L	N	S	P	T	V	M	-
✓ 146. LPAL13 100010200 Leishmania panamensis MHOM/COL/81/L13 major surface protease gp63 putative protein length=439	V	L	T	R	A	V	A	H	E	V	A	H	A	L	G	F	S	R	N	Y	F	E	R	A	G	L	L	T	N	A	S	H	V	R	G	K	F	F	S	V	P	V	M	N	S	S	T	V	-	
✓ 147. LPAL13 100010600 Leishmania panamensis MHOM/COL/81/L13 major surface protease gp63 putative protein length=419	G	A	T	R	T	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	S	S	T	F	F	K	S	A	G	I	V	K	S	V	T	N	L	R	G	K	P	F	A	A	P	V	I	N	S	S	T	V	-	
✓ 148. LPAL13 000016400 Leishmania panamensis MHOM/COL/81/L13 major surface protease gp63 putative protein length=333	F	M	V	R	T	V	T	H	E	I	T	H	A	L	G	F	D	L	T	V	F	E	D	M	E	I	V	D	E	V	S	N	L	R	G	K	D	Y	Y	V	P	V	I	N	S	P	T	V	-	
✓ 149. LPMP 100410 Leishmania panamensis strain MHOM/PA/94/PSC-1 GP63 leishmanolysin protein length=594	G	A	T	R	V	T	H	E	V	A	H	A	L	G	F	S	S	T	F	F	K	S	A	G	I	V	K	S	V	T	N	L	R	G	K	P	F	A	A	P	V	I	N	S	S	T	V	-		
✓ 150. LPMP 100420 Leishmania panamensis strain MHOM/PA/94/PSC-1 GP63 leishmanolysin protein length=587	V	L	T	R	A	V	A	H	E	V	A	H	A	L	G	F	S	R	N	Y	F	E	R	A	G	L	L	T	N	A	S	H	V	R	G	K	F	F	S	V	P	V	M	N	S	S	T	V	-	
✓ 151. LPMP 100430 Leishmania panamensis strain MHOM/PA/94/PSC-1 GP63 leishmanolysin protein length=489	I	M	V	R	T	V	A	H	E	V	A	H	A	L	G	F	D	L	T	L	F	D	E	L	E	L	I	H	E	V	S	D	L	R	G	K	D	Y	E	V	P	V	L	N	S	P	T	V	M	-
✓ 152. LPMP 100440 Leishmania panamensis strain MHOM/PA/94/PSC-1 GP63 leishmanolysin protein length=584	I	M	V	R	T	V	A	H	E	V	A	H	A	L	G	F	N	R	I	F	F	D	S	A	G	M	V	A	A	A	I	G	I	R	G	K	D	Y	Y	A	P	V	I	N	S	S	T	V	-	
✓ 153. LMARLEM2494 100009500 Leishmania sp. MAR LEM2494 major surface protease gp63 putative protein length=621	G	V	T	R	V	V	A	H	E	M	A	H	A	L	G	F	S	S	T	F	L	N	S	A	G	M	V	Q	R	V	S	G	L	R	G	K	D	F	D	V	P	V	I	N	S	S	T	V	-	
✓ 154. LMARLEM2494 280012000 Leishmania sp. MAR LEM2494 major surface protease gp63 putative protein length=566	-	T	V	R	I	V	T	H	E	L	L	H	A	L	G	F	G	I	E	T	F	T	R	R	R	M	V	S	H	F	Q	L	R	G	K	D	M	-	-	L	V	G	I	T	S	A	N	V	L	-
✓ 155. LtaP10.0490 Leishmania tarentolae Parrot-Tarll Major surface protease gp63 putativeGP63 leishmanolysin protein length=958	F	V	R	I	A	H	E	V	A	H	A	L	G	F	S	R	N	Y	F	F	Q	A	A	G	I	L	N	R	V	P	N	V	R	G	K	P	F	R	V	P	V	I	N	S	T	T	V	-		
✓ 156. LtaP10.0500 Leishmania tarentolae Parrot-Tarll Major surface protease gp63 putativeGP63 leishmanolysin protein length=385	A	V	T	R	A	V	A	H	E	M	A	H	A	L	G	F	S	V	N	F	F	K	A	S	S	I	L	K	Y	M	R	S	V	R	G	K	D	F	S	V	P	V	I	N	S	S	T	V	-	
✓ 157. LtaP10.0520 Leishmania tarentolae Parrot-Tarll Major surface protease gp63 putativeGP63 leishmanolysin protein length=545	A	I	T	R	V	A	H	E	V	A	H	A	L	G	F	S	N	V	Y	F	E	T	A	G	I	L	Q	G	V	S	N	V	R	G	K	P	D	S	V	P	V	I	G	S	S	T	V	-		
✓ 158. LtaP10.0530 Leishmania tarentolae Parrot-Tarll Major surface protease gp63 putativeGP63 leishmanolysin protein length=450	A	V	T	R	I	V	A	H	E	M	A	H	A	L	G	F	T	S	I	S	F	K	S	A	G	I	L	N	N	R	S	K	I	R	A	K	P	F	K	V	P	V	I	N	S	S	T	V	-	
✓ 159. LtaP10.0540 Leishmania tarentolae Parrot-Tarll Major surface protease gp63 putativeGP63 leishmanolysin protein length=182	V	V	T	R	V	V	A	H	E	M	A	H	A	L	G	F	T	R	H	F	F	K	A	A	G	I	L	E	H	L	R	N	V	R	G	K	P	F	R	V	P	V	I	T	S	S	T	V	-	
✓ 160. LtaP10.0560 Leishmania tarentolae Parrot-Tarll Major surface protease gp63 putativeGP63 leishmanolysin protein length=127	A	I	T	R	A	T	S	H	E	V	A	H	A	L	G	F	T	I	R	F	F	Q	Q	A	A	M	L	K	S	L	P	N	V	R	D	K	P	G	S	V	P	V	I	T	S	R	T	A	V	-
✓ 161. LtaP10.0650 Leishmania tarentolae Parrot-Tarll Major surface protease gp63 putativeGP63 leishmanolysin protein length=508	L	V	T	R	V	V	A	H	E	M	A	H	A	L	G	F	S	S	T	V	F	E	A	A	G	M	L	Q	S	I	P	N	V	R	G	K	P	T	L	T	P	I	M	N	S	S	T	V	-	
✓ 162. LtaP10.0820 Leishmania tarentolae Parrot-Tarll Major surface protease gp63 putativeGP63 leishmanolysin protein length=569	A	V	M	R	T	V	T	H	E	M	A	H	A	L	G	F	S	K	E	F	F	Q	E	A	G	M	L	D	D	I	L	N	V	R	G	R	P	F	N	V	S	M	I	D	G	S	T	V	-	
✓ 163. LtaPcontig00616-1 Leishmania tarentolae Parrot-Tarll Major surface protease gp63 putativeGP63 leishmanolysin protein length=458	L	L	I	R	S	S	A	H	E	A	A	H	A	L	G	F	S	K	P	F	F	K	S	A	G	I	L	K	R	V	P	N	V	R	G	K	D	F	R	V	P	V	I	N	S	T	T	V	-	
✓ 164. LtaPcontig03442-1 Leishmania tarentolae Parrot-Tarll Major surface protease gp63 putativeGP63 leishmanolysin protein length=383	A	V	T	R	V	T	H	E	M	A	H	A	L	G	F	S	I	O	F	F	R	K	A	Q	K	V	F	S	V	R	N	V	R	G	R	P	H	T	T	L	A	L	S	N	T	D	L	L	R	-
✓ 165. LtaPcontig05680-1 Leishmania tarentolae Parrot-Tarll Major surface protease gp63 putativeGP63 leishmanolysin protein length=195	T	V	T	R	V	V	A	H	E	I	A	H	A	L	G	F	S	K	P	F	F	E	A	A	G	I	L	Q	Q	V	S	N	V	R	G	K	D	F	R	V	P	V	I	N	S	R	T	V	-	
✓ 166. LTRL590 280010900 Leishmania tropica L590 major surface protease gp63 putative protein length=566	-	T	V	R	V	I	A	H	E	V	L	H	A	L	G	F	T	R	S	V	F	Q	E	R	N	M	L	A	M	A	S	F	R	G	K	S	P	-	-	S	P	V	I	R	S	E	K	V	-	
✓ 167. LTULEM423 280011400 Leishmania turanica strain LEM423 major surface protease gp63 putative protein length=566	-	T	V	R	V	I	A	H	E	V	L	H	A	L	G	F	S	R	S	V	F	Q	E	R	N	M	L	A	M	A	S	F	R	S	K	S	P	-	-	S	P	V	I	R	S	E	K	V	-	

Site#

1

/1272

Conserved:60/1272

167 taxa selected

Data

HEXXHXXGXXH

HEXXHXLGFXH

Análisis realizado en MEGA[X] 2020

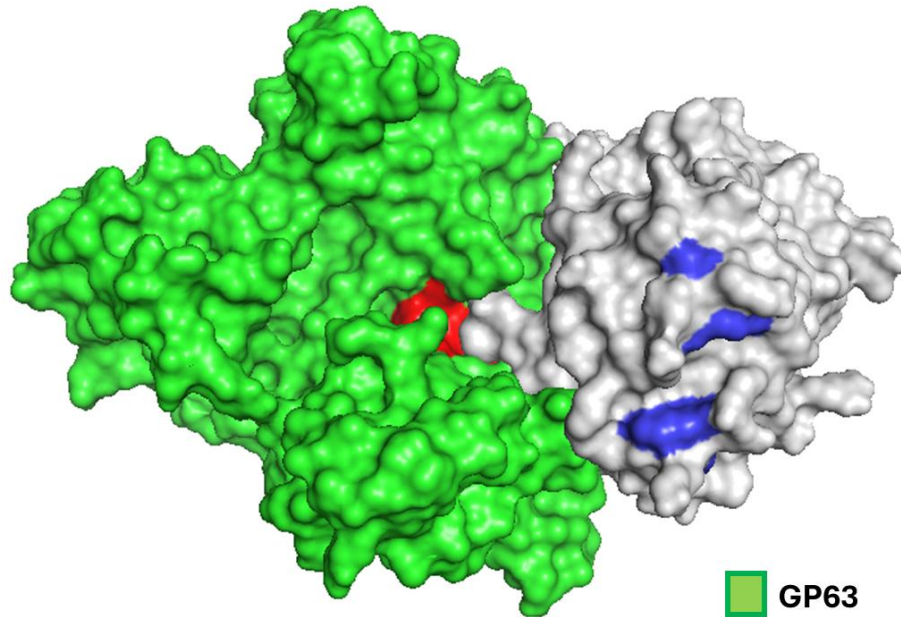
ANEXO 2 Listado de proteínas de la señalización de los Linfocitos B.

Proteína / Molécula	Función principal	Peso aprox. (kDa)
CD79A (Igα)	Parte del correceptor del BCR, contiene ITAMs para iniciar señalización	47
CD79B (Igβ)	Asociada al BCR, transmite señales junto con Igα	37
SYK (Spleen Tyrosine Kinase)	Tirosina quinasa esencial para fosforilar ITAMs y activar cascadas	72
Lyn (Src family kinase)	Fosforila ITAMs en Igα/Igβ, activa SYK	56
BLNK (SLP-65)	Adaptador que organiza complejos de señalización aguas abajo del BCR	65
BTK (Bruton's Tyrosine Kinase)	Activa PLCγ2 y regula el flujo de Ca ²⁺	77
PLCγ2 (Phospholipase Cy2)	Hidroliza PIP ₂ → IP ₃ + DAG; controla Ca ²⁺ y PKC	150
Vav (GEF)	Activa GTPasas como Rac → remodelación del citoesqueleto	95
PI3K (p85/p110)	Fosforila PIP ₂ → PIP ₃ , activa AKT y vías de supervivencia	p85:85 / p110:110
AKT (Protein Kinase B)	Quinasa central de supervivencia y metabolismo	56
mTOR	Regula metabolismo, crecimiento y diferenciación	289
NF-κB (p50/p65)	Factor de transcripción para supervivencia y proliferación	p50:50 / p65:65
NFAT	Factor de transcripción dependiente de Ca ²⁺ /calcineurina	90–110
ERK1/2 (MAPK family)	Controlan proliferación y diferenciación	ERK1:44 / ERK2:42
JNK	Regula apoptosis y activación génica	46–55
p38 MAPK	Respuesta a estrés, inflamación	38
CD19	Co-receptor del BCR, amplifica la señalización vía PI3K	95
CD21 (CR2)	Receptor del complemento que potencia señalización del BCR	145
CD22	Molécula inhibidora, recluta fosfatasas SHP-1	140
FcγRIIB (CD32)	Receptor inhibidor, contiene ITIMs que limitan señalización	40
Grb2	Adaptador que conecta BCR con vía Ras/MAPK	25
Dok (Downstream of kinase)	Adaptador regulador de señales inhibidoras	62

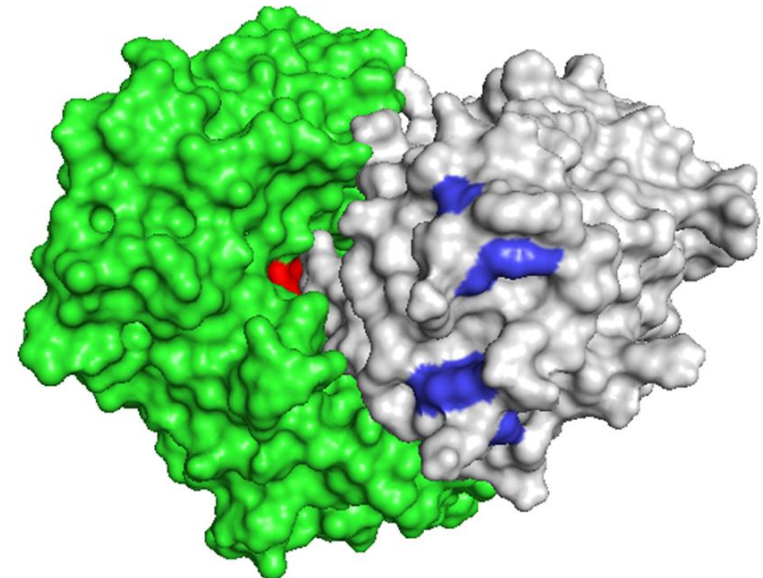
ANEXO 3 Resultados del proceso de estandarización del docking molecular entre GP63 y el control CXCL10.

Docking Molecular entre GP63 (1LML) vs CXCL10 (1O7Y)
Plataforma Cluspro sin restricción sin Zn^{2+}

MODELO 01



MODELO 07



- GP63
- CXCL10
- Centro activo
- Sitio de corte postulado por Antonia et al., (AIK)

Figura 50 Docking molecular entre GP63 vs CXCL10.

Se observa que la secuencia de corte postulada por el grupo del Dr. Ko (Antonia et al., 2021) no coincide con la regla de corte postulada para GP63, tampoco coincide con las imágenes reportadas por ellos. Este ejercicio se realiza en Cluspro con fines de poder estandarizar el docking molecular y conocer el performance de la única secuencia cristalizable de GP63.

**Docking Molecular entre GP63 (1LML) vs CXCL10 (1O7Y)
Plataforma Cluspro con restricción (AIK) sin Zn²⁺**

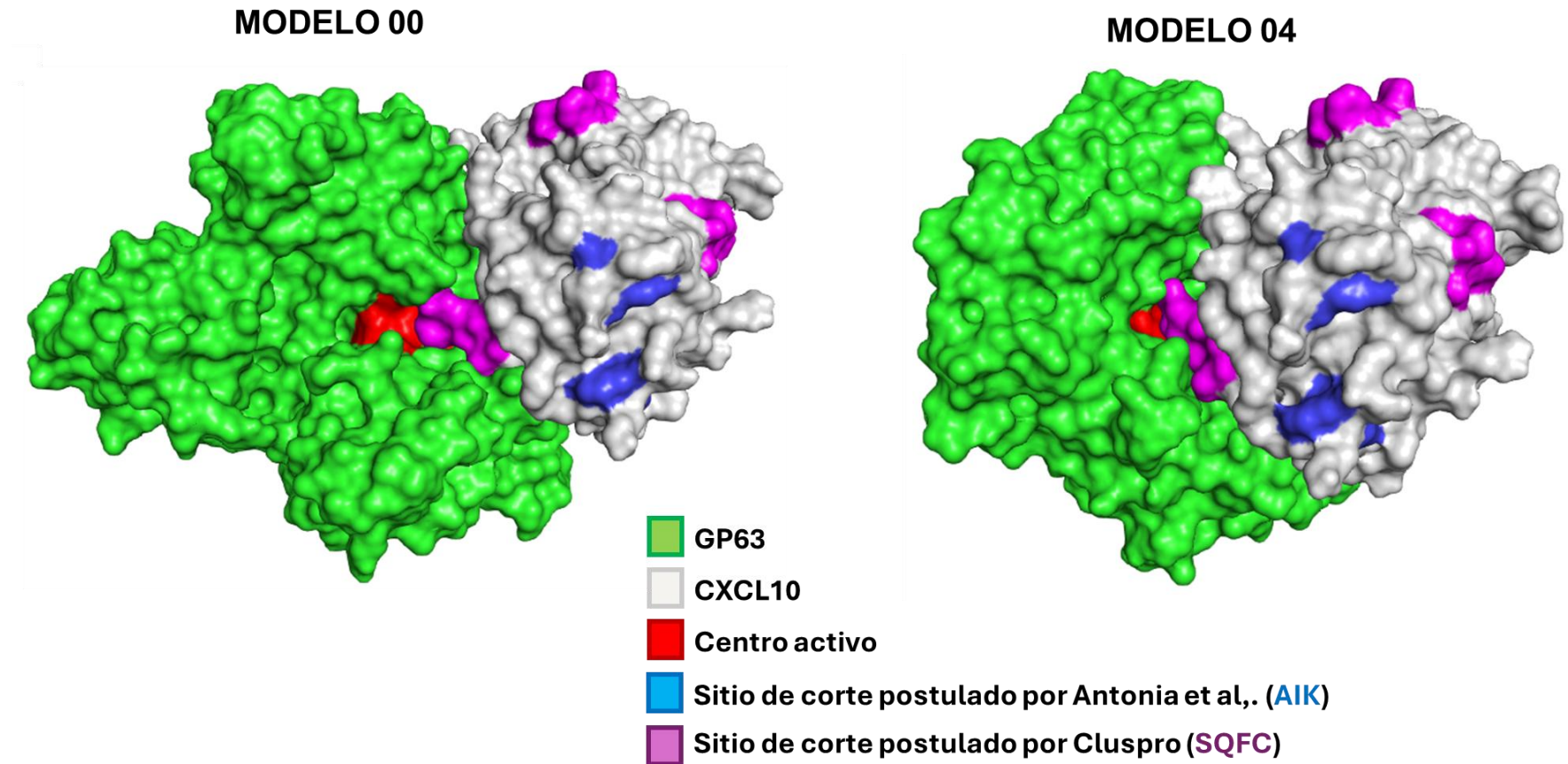


Figura 51 Docking molecular entre GP63 vs CXCL10 con restricciones en Cluspro.

Se observa que la secuencia de corte postulada por el grupo del Dr. Ko (Antonia et al., 2021) no ingresa al centro activo ni con las restricciones sobre AIK sugeridas. Este ejercicio se realiza en Cluspro siendo una plataforma de docking rígido y sin integración de metales, el cual es importante para la actividad catalítica de la proteína.

Docking Molecular entre GP63 (1LML) vs CXCL10 (1O7Y)
Plataforma Haddock con restricción (AIK) sin Zn^{2+}

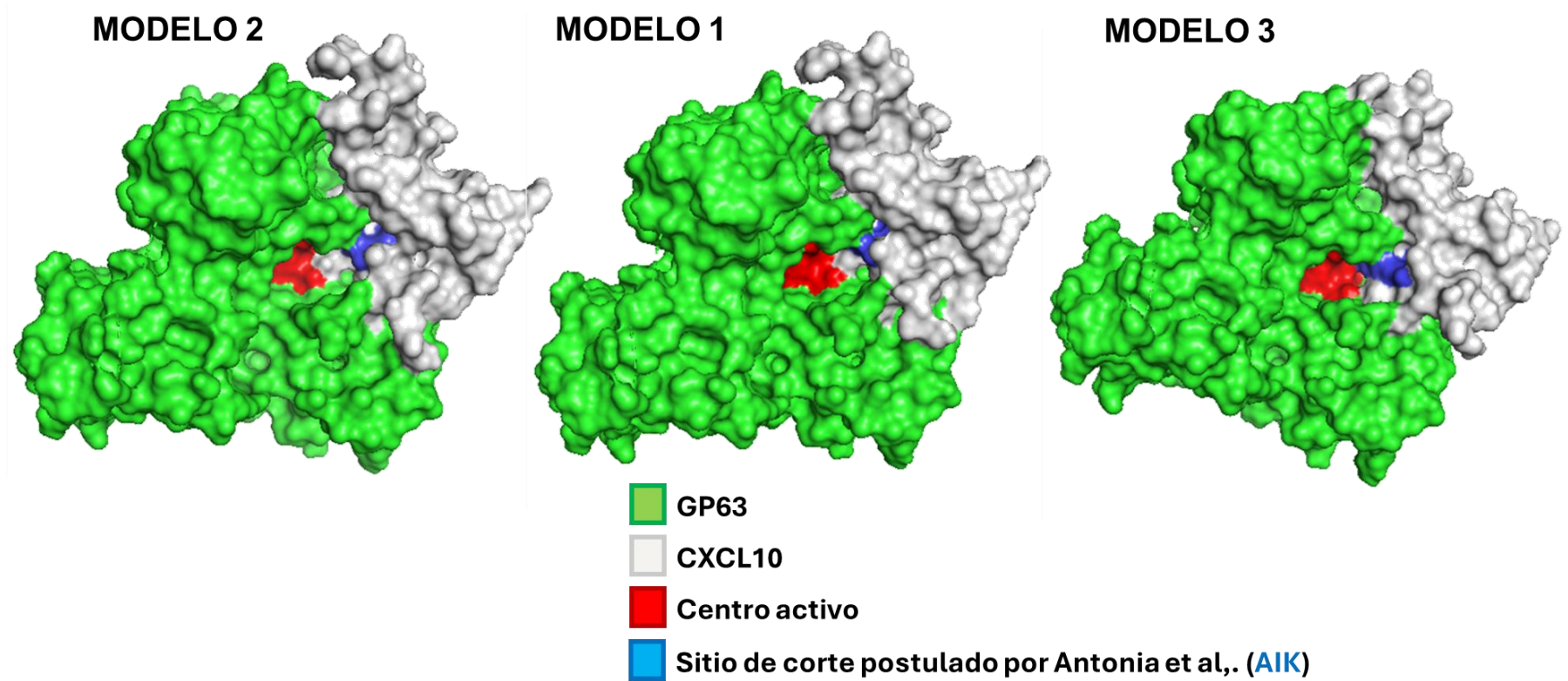


Figura 52 Docking molecular entre GP63 vs CXCL10 con restricciones en Haddock.

Se observa que la secuencia AIK no ingresa al centro activo completamente a pesar de las restricciones. Este ejercicio se realiza en Haddock una plataforma de docking semi-rígido, permitiendo un mejor acoplamiento de las proteínas y leves cambios estructurales durante la simulación.

**Docking Molecular entre GP63 (1LML) vs CXCL10 (1O7Y)
Plataforma Haddock con restricción (AIK) con Zn^{2+}**

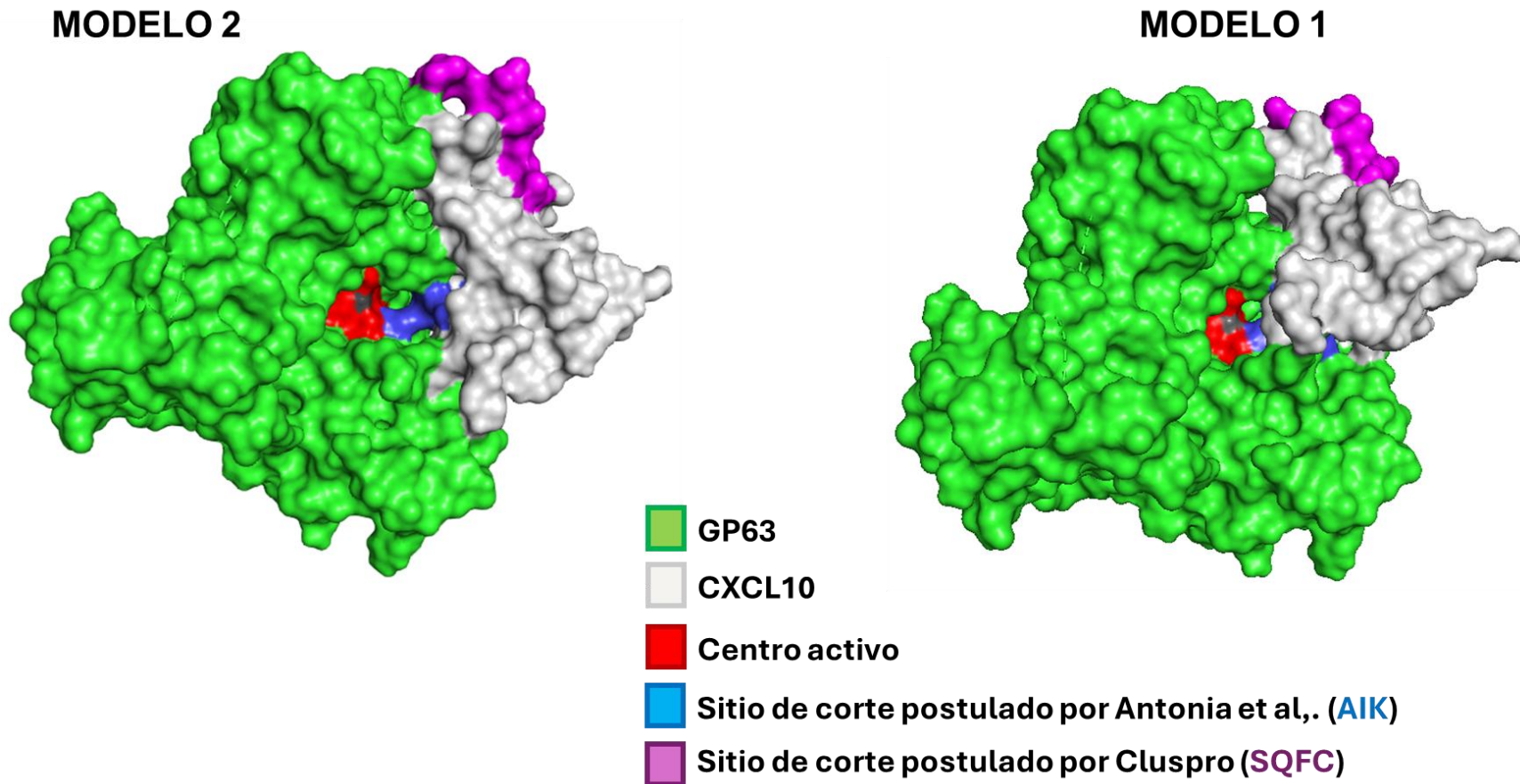


Figura 53 Docking molecular entre GP63 vs CXCL10 con restricciones y adición del Zinc, en Haddock.

Se observa que la secuencia AIK ingresa al centro activo completamente gracias al efecto del zinc incorporado en la simulación. Este ejercicio se realiza en Haddock donde sí se permite la inclusión de metales. Esto refleja que la selección de una plataforma robusta permite hacer inferencias *in silico* más acertadas. Con el protocolo establecido, se procede al docking con la proteína diana.

GP63 sequences

P08148: *L. major* GP63 (Genbank Refseq)

E9BK98: *L. donovani* GP63 (Addgene plasmid)

E9BK98-1	-----WRRTLGIANVFALVCCVVGAGAA	GGDFERADEEFPFCGFDELFARM 47	
P23223-1	MSVDSSTHRRSVARVLRLAAGAAVTAIVGTAAM	---AHAGAVOHRCHIDMAQARY 57	
P08148	MSVDSSTHRRSVARVLRLAAGAAVTAIVGTAAM	---AHAGAVOHRCHIDMAQARY 57	
	: *: :*: : *	:*: :*: :*	:*: :*: :*
E9BK98-1	-----VISRPFPTGELAVAAATGAQWOFIRIAVFTED 86		
P23223-1	ROSVARHHTAPAGASAVGLSVYLTGAA	-----PTVVRANWGLARIASVATED 104	
P08148	ROSVADHHKAPGASAVGLPVYLTDLAAHTAAAD	PRPGARSVYDVMNGVARIASVATED 117	
	:*: :*: :*	:*: :*: :*	:*: :*: :*
E9BK98-1	INSNSOHTASQGRPTFRGGVRVTCSAADVITREKKRVLLELIPSAVOLHQRINLYORE 146		
P23223-1	LTDSAYHCAVQGRISTROGRFALCTAEDILTEKRDILNVLKYLIPQALQHLTERUKVROY 164		
P08148	LTDPAVHCARQGVHDKHAGALVCTCAEDILTEKRDILNVLKYLIPQALQHLTERUKVQOY 177		
	:*: :*: :*	:*: :*: :*	:*: :*: :*
E9BK98-1	NGNIWSPFIKKHSICQFSPIEEMHKTGVPDADFLVMASAAFTSGSVIAWAKQCSQFN 206		
P23223-1	QOKKKVTKM--GNIEIGHKPKYPAHITIGLNTDFVMKVASPESGDVLAWATTCOVFSD 222		
P08148	QOKKKVTKM--VGIIDGKFVKPQAHITEGNTDFVMKVASPESGVLAWATTCOTFSD 235		
	:*: :*: :*	:*: :*: :*	:*: :*: :*
E9BK98-1	GRSSVGVATISPKYITAE--PKTVRVVAHEVLHALGTFRSVFQOQMLVMA--SFRG-KSP 262		
P23223-1	GHPAVGINI PAANIASRVDQILTRVVVTHEMAHALGFSVFPFDARILESISVNRHDFD 282		
P08148	GHPAVGINI PAANIASRVDQILTRVVVTHEMAHALGFSGFFFEDARIIVANVFNVRKGFN 295		
	:*: :*: :*	:*: :*: :*	:*: :*: :*
E9BK98-1	SPVIRSANTVQAQOLHVQCKTQASMELEDEGGKGVSSHKKRSAKDELMAGFSGVYKS 322		
P23223-1	VFVINSSTAVAREQQGCTLEYLEMDQGGAGSAGSHIMKNNAQDELMAPASDAGIYS 342		
P08148	VFVINSSTAVAREQQGCTLEYLEVEQGGAGSAGSHIMKNNAQDELMAPAAAAGIYT 355		
	:*: :*: :*	:*: :*: :*	:*: :*: :*
E9BK98-1	ALTIAMETGYGVGNVAKAPMAYGHEVGVCKLSERRCVIKTSQIPIAMFCQADPAFWSC 383		
P23223-1	ALTIAPFDLGYQADFSKAEEMWGRNAGCALISEKCMEDGTTWPFAMFCNENETMRC 402		
P08148	ALTIAPFDLGYQADFSKAEVMEWGNAGCALITKCMQESVTQWPFAMFCNESEDAIRC 415		
	:*: :*: :*	:*: :*: :*	:*: :*: :*
E9BK98-1	TSDRRGRCILITSYNSNLTIFYQTFGDFRLLGGDFPLMDFCPVRAADDTCMAAKTALNK 442		
P23223-1	HTGRALISYGVNLTPIPPYQWYQTFDPLLAGISAFMDYCPVWVYFQDSCAQRASEAG 462		
P08148	PTSRLSLGAGGVTR--HEGLPPYQWYQTFDPLSLAGSFAHMDYCPVWVYFQDSCGTORASEAH 471		
	:*: :*: :*	:*: :*: :*	:*: :*: :*
E9BK98-1	G-----SVYGVMSRYDTPAGFST--DQSAVQHQHICAEVQCGS---SAVGVKINGASAFRD 494		
P23223-1	APFGKTVSDAARCIDGAFAPKRTITVNSYAGLCANVRCDARTRTVQVHVHGSYAN 522		
P08148	ASLUPFNVSDAARCIDGAFAPKATIGIVKSYAGLCANVCOCDARTRTVQVHGSNYTN 534		
	:*: :*: :*	:*: :*: :*	:*: :*: :*
E9BK98-1	CPFGSTYNLTLSFSFKG--HLVCFPSYEVSCAINASLIVEYSRLTIDHSVTGARTSVT 553		
P23223-1	CTPGLRYELSTVSSAFEEGGVITCPFYVEVCOGNQOAAKOGNLA	---AGRRGGPSAAAT 578	
P08148	CTPGLRYELSTVSNAGFEEGGVITCPFYVEVCOGNQOAAKOGNTA	---AGRRGGPSAAAT 590	
	:*: :*: :*	:*: :*: :*	:*: :*: :*
E9BK98-1	AVV-AVLLVLEMG 566		
P23223-1	ALIVPAALLAVAL 590		
P08148	ALIVPAALLAVAL 602		
	:*: :*: :*	:*: :*: :*	:*: :*: :*

ANEXO 5 Transfección de LB Ramos con plásmido pHL20MND gp63 WT utilizando AMAXA 'Kit V' Programa W-001.

El Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit V (Lonza) es un sistema optimizado para la transfección de líneas celulares difíciles de modificar genéticamente, empleando la tecnología de nucleofección, que combina pulsos eléctricos precisos con una solución tampón específica que facilita la entrada directa de ADN, ARN o proteínas al núcleo celular. Está diseñado principalmente para células en cultivo en suspensión o adherentes con baja eficiencia de transfección mediante métodos convencionales. Entre sus ventajas, ofrece altas tasas de transfección incluso en líneas celulares consideradas “difíciles”, rápida expresión transitoria o estable de los constructos, y mínima dependencia de reactivos químicos que puedan interferir con la fisiología celular. Entre sus desventajas, el procedimiento puede inducir cierto grado de estrés celular y reducir la viabilidad, requiere equipamiento especializado (Nucleofector® Device) y el kit es de costo relativamente alto.

Tomado de: Lonza. (2020). Cell Line Nucleofector® Kit V – Product Manual (Rev. 06). Lonza Group Ltd. <https://bioscience.lonza.com>.

ANEXO 6 Protocolo: Transfección transitoria de HEK293T (ATCC® CRL-11268™) con PEI 25 kDa para expresión de proteína recombinante GP63.

Resumen rápido

- Células: HEK293T adherentes en flask 75 cm².
- Siembra: 10×10^6 células por flask (objetivo: confluencia >85 % al momento de transfectar).
- Plásmido: 90 µg DNA por flask.
- PEI lineal 25 kDa: relación PEI:DNA **3:1 w/w** (es decir 270 µg PEI por 90 µg DNA).
- Medio: IMDM + 10 % FBS + 1 % Pen/Strep; Opti-MEM™ para la mezcla PEI/DNA (medio libre de suero/antibiótico).
- Incubaciones: analizar 24, 48, 72 y 96 h (cosechar sobrenadante en cada punto).
- Centrifugado: $3.000 \times g$, 10 min → filtrar 0.45 µm → conservar en frío/alícuotas.

Reactivos y materiales (por 1 flask 75 cm²)

- HEK293T (ATCC® CRL-11268™), cultivadas en IMDM + 10 % FBS + 1 % Pen/Strep.
- Plásmido codificante para GP63 (90 µg por flask).
- PEI lineal 25 kDa (por ejemplo 1 mg/mL stock en agua estéril).
- Opti-MEM™ (medio sin suero ni antibióticos) para diluir DNA y PEI.
- IMDM completo (precalentado a 37 °C) para reponer en los flask.
- Centrifuga de mesa, tubos con capacidad adecuada, filtros de jeringa 0.45 µm (o 0.22 µm si quieres mayor purificación).
- Filtros y material estériles de cultivo.
- Tubos para almacenamiento criopresevación a 4 °C / -80 °C (alícuota).
- Controles: flask con solo células y medio (mock), flask con PEI sin DNA, y si le es posible, un control de transfección con un plásmido que exprese proteína de control conocida (p.ej. GFP).

Preparación previa

1. **Calidad del DNA:** usar DNA plasmídico purificado para expresión.
2. **Preparación stock PEI (ejemplo):** disolver PEI lineal 25 kDa a **1 mg/mL** en agua ultrapura; ajustar pH a 7.0–7.2 si es necesario; filtrar estéril (0.22 µm) y congelar en alícuotas a –20 °C. (Si tu stock es otra concentración, ajustar cálculos).
3. **Células:** sembrar 10×10^6 células por flask 75 cm² 18–24 h antes de transfección para alcanzar >85 % confluencia al momento de la transfección. Verificar salud y viabilidad >90 %.
4. **Precalentar medios** a 37 °C.

Cálculos (por flask 75 cm²; 90 µg DNA, ratio 3:1 PEI w/w)

- DNA = **90 µg**.
- PEI (3:1 w/w) = $90 \text{ µg} \times 3 = \mathbf{270 \text{ µg}}$ PEI.
- Si PEI stock = **1 mg/mL** → volumen PEI = 270 µL.
- Preparación final de complejos: diluir DNA y PEI por separado en Opti-MEM y luego mezclar (ejemplo abajo).

Preparación de la mezcla PEI : DNA (ejemplo práctico)

Aquí propongo un esquema reproducible que genera **~5 mL** de complejos.

1. En condiciones estériles:
 - Tubo A (DNA): añadir **90 µg DNA** y completar con Opti-MEM hasta **2.5 mL**. (Si el DNA está más concentrado, ajustar el volumen).
 - Tubo B (PEI): añadir **270 µL** PEI 1 mg/mL y completar con Opti-MEM hasta **2.5 mL**.
2. Agitar suavemente cada tubo (no vortex vigorosamente).
3. Añadir el contenido del Tubo B (PEI) al Tubo A (DNA) **goteando** o en 2–3 alícuotas, mezclando suavemente con pipeta.
4. Incubar **10 minutos a temperatura ambiente** (formación de complejos). No exceder 30 min.
5. Resultado: **~5.0 mL** de mezcla PEI:DNA lista.

Transfección de células HEK293T

Preparar flask: Retirar el medio viejo. Añadir **10 mL de medio completo IMDM** al flask. (Alternativa: algunos protocolos no reemplazan el medio y añaden complejos directamente; recomendando reemplazar con 10 mL fresco para estandarizar).

1. **Añadir complejos:** Añadir la mezcla PEI:DNA (~5 mL) **gota a gota** sobre la superficie del cultivo, moviendo suavemente el flask para distribuir. Evitar concentrar en un solo punto.
2. **Incubar:** Dejar las células a 37 °C, 5 % CO₂.
3. **Puntos de cosecha:** recolectar sobrenadante a **24, 48, 72 y 96 h**. Para cada punto:
 - Aspirar el sobrenadante en frío a tubos estériles, reemplazar inmediatamente con medio fresco sin PEI ni DNA (10 mL).
 - Centrifugar los sobrenadantes a **3.000 × g, 10 min** a 4 °C para eliminar células y detritos.
 - Filtrar el sobrenadante con filtro 0.45 µm (o 0.22 µm si deseas mayor claridad).
 - Alícuota y conservar a **4 °C** para uso inmediato o a **-80 °C** para almacenamiento a largo plazo (evita ciclos repetidos de congelación/descongelación).

Si además quieres proteína intracelular, recolecta alícuotas de células (lisis con buffer RIPA o con mPER™ Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific)) en los mismos puntos temporales.

Concentración (opcional)

- Si el sobrenadante tiene baja concentración de proteína, concentrar con filtros centrifugadores (En este caso utilizamos Vivaspin 20, 20mL Prot 30KDa # VS2021 de 30 kDa).
- Para proteínas con His-tag: purificación por Ni-NTA directamente desde sobrenadante (previamente equilibrado) o tras concentración. Asegurar condiciones de pH y sales compatibles.

Análisis / QC de la proteína

- Medir concentración total (BCA o Bradford) o por ELISA en este caso utilizamos His-Tag ELISA Detection Kit de GenScript (Cat. No. L00436).

- SDS-PAGE y Western blot (anti-His, anti-GP63 o anticuerpo específico).
- Ensayo de actividad enzimática (si aplicable) para confirmar funcionalidad (Ej. Azocaseína assay).

Seguridad y buenas prácticas

- Manejar HEK293T y plásmidos en condiciones de BSL-2 (según normativa local).
- Usar guantes, bata, protección ocular.
- El PEI es tóxico, evitar contacto directamente con la piel y la inhalación; manipular en campana de bioseguridad.
- Eliminar residuos biológicos y químicos conforme a protocolos institucionales.
- Registrar lote y fecha de preparación del PEI.

Posibles problemas y soluciones rápidas

- **Baja expresión**
 - Verifica calidad/concentración del DNA.
 - Revisa la relación PEI:DNA (puedes probar 2:1, 3:1, 4:1 en optimización).
 - Evalúa cambiar el punto de siembra (confluencia ideal 70–90 %) ya que demasiada confluencia puede reducir la expresión.
 - Comprueba la integridad del promotor en el plásmido y la secuencia de inserción.
- **Alta citotoxicidad**
 - Reduce la cantidad de PEI (prueba 2:1) o cambia a procedimiento de cambio de medio a las 4–6 h.
 - Asegúrate que no se usó PEI viejo o no neutralizado.

Notas finales / recomendaciones prácticas

- En la comparación WT vs mutante, preparar **mezclas separadas** y evita cross-contaminación. Mantener el mismo número de células, la misma cantidad de DNA y condiciones idénticas entre réplicas.

- Si planeas purificar grandes cantidades, considera usar sistemas de cultivo en mayor volumen (biorreactores adherentes o suspensión), o cambiar a expresión estable para mayor rendimiento.

Transfección 2×10^6 LB Ramos con plásmido pHL20MND gp63 WT

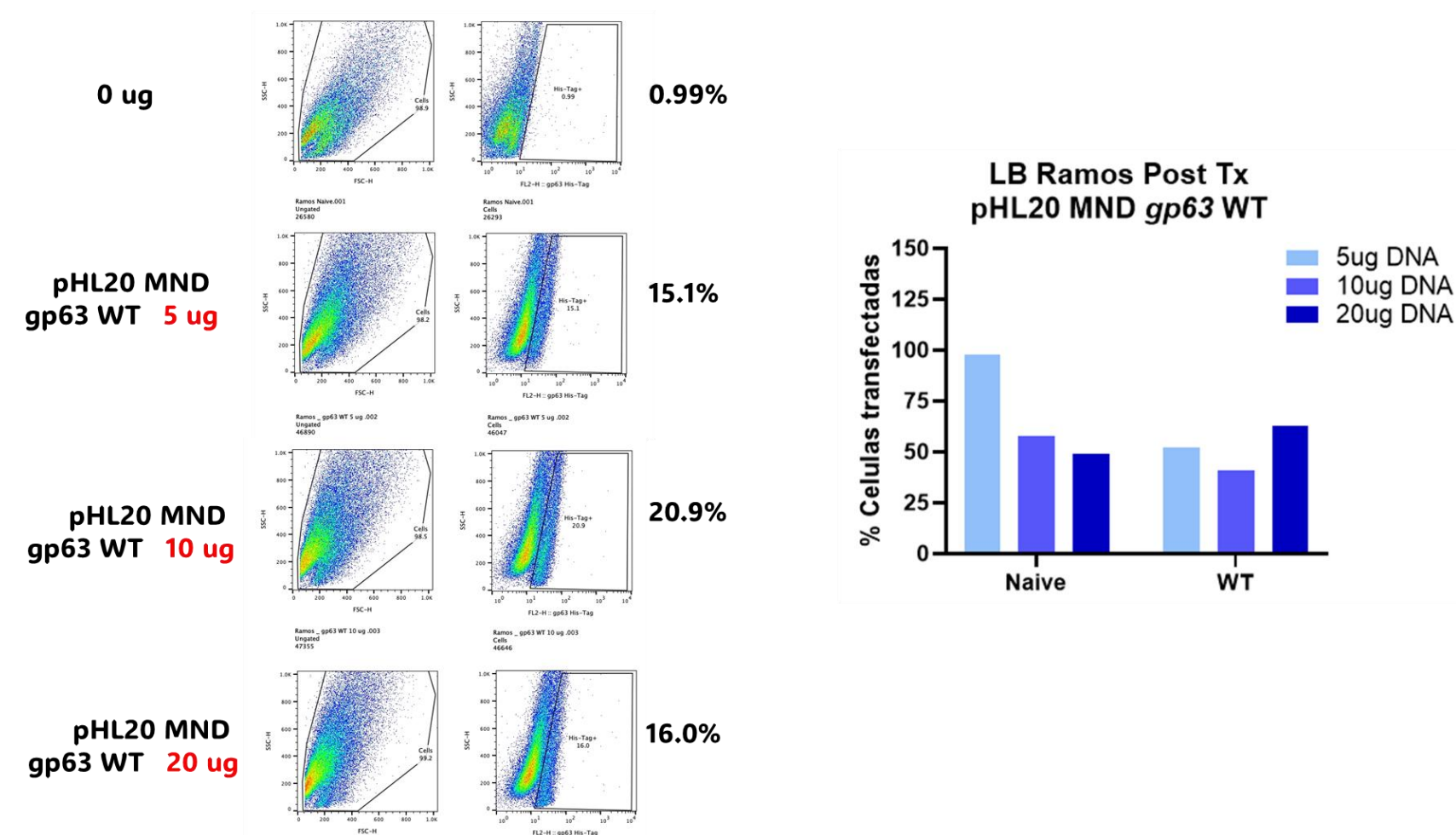


Figura 54 Porcentaje de transfección de LB Ramos utilizando AMAXA 'Kit V' Programa W-001.

Se observan los porcentajes de transfección de los LB Ramos transfectadas con el plásmido pHL20MND gp63 WT a diferentes dosis de DNA plasmídico (5,10,20 μ g), sin alcanzar más del 20% de transfección, siendo un resultado subóptimo.

ANEXO 7 Protocolo: Transducción de linfocitos B Ramos y MNSP humanos con lentivirus codificante para GP63.

Resumen

- **Objetivo:** Introducir y expresar la proteasa GP63 (WT o mutante) en LB Ramos y MNSP humanos mediante un vector lentiviral de tercera generación.
- **Vectores empleados:**
 - **LV-MND-GP63 WT o mutante (mt)** (Ver capítulo 2) vector de interés.
 - **LV-EF1 α -GFP** – control de transducción (proporcionado por Dr. Uimook Choi, LCIM-GIS, NIH).
- **Sistema de producción:** partículas virales producidas en células HEK293-GPRTC, concentradas por ultra centrifugación y tituladas previamente.

Reactivos y materiales

- **Células blanco:**
 - Línea Ramos (LB humanos, ATCC CRL-1596).
 - MNSPs de donantes sanos → aislamiento de MNSP mediante gradiente (ej. Ficoll).
- **Medio de cultivo:** RPMI 1640 + 10 % FBS (calor inactivado, lote testado), 1 % Pen/Strep.
- **Vectores lentivirales:**
 - LV-MND-GP63 WT o mt.
 - LV-EF1 α -GFP (control positivo).
- **Potenciadores de transducción:**
 - LentiBOOST™ (Sirion Biotech) – 1 μ g/mL.
 - Polybrene (hexadimetrina bromuro, Sigma-Aldrich) – 8 μ g/mL.
- **Otros:** PBS estéril, tubos de cultivo, centrifuga, incubadora 37 °C / 5 % CO₂.

Cálculo del MOI

1. Determinar el **título viral** (TU/mL) previamente mediante transducción de células HEK293T o un ensayo estándar (ej. qPCR).

2. Calcular el volumen de virus necesario.

$$\text{Volumen de virus } (\mu\text{L}) = \frac{\text{MOI deseado} \times \text{N}^{\circ} \text{ de células}}{\text{Título viral (TU}/\mu\text{L})}$$

3. MOI recomendado inicial: 5–20 (optimizar según tipo celular).
 - Ramos suelen requerir MOI alto.
 - MNSP primarias pueden ser más sensibles → iniciar con MOI 10 y ajustar.

Procedimiento de transducción

Día 0: Preparación de células

1. **Contar y ajustar densidad celular:**
 - Ramos: $0.5\text{--}1 \times 10^6$ células/mL en RPMI completo.
 - MNSP: 1×10^6 células/mL en RPMI completo.
2. Colocar células en placas de 24 pozos o tubos de 15 mL estériles, en volúmenes de 0.5–1 mL (según ensayo).

Día 0: Adición de potenciadores y virus

1. Añadir **potenciador de transducción**:
 - LentiBOOST™ a 1 µg/mL o Polybrene a 8 µg/mL.
 - Nota: para células primarias humanas, LentiBOOST™ suele ser menos tóxico que Polybrene.
2. Agregar el **volumen de virus calculado** (según MOI). Mezclar suavemente.
3. **Opcional (spinoculación)**: centrifugar las placas/tubos a $800 \times g$ por 60 min a 32 °C para aumentar la eficiencia de entrada.
4. Incubar las células a 37 °C, 5 % CO₂.

Día 1: Cambio de medio

- Después de 12–16 h, reemplazar el medio por RPMI completo fresco (sin potenciador ni virus) para reducir toxicidad.

Días 2–3: Evaluación de la transducción

1. A las **48 y 72 h post-transducción**, recolectar células para evaluar eficiencia:

- **Para GFP (control positivo):** citometría de flujo directa (canal FITC).
- **Para GP63 WT o mt:**
 - Tinción intracelular (anticuerpo anti-GP63) + FACS.
 - RT-qPCR para RNA viral/inserto para (Vector copy number) VCN.

2. Mantener controles:

- Células sin virus y sin lentiboost.
- Células con LV-GFP (control de transducción).
- Células con solo lentiboost (control negativo).

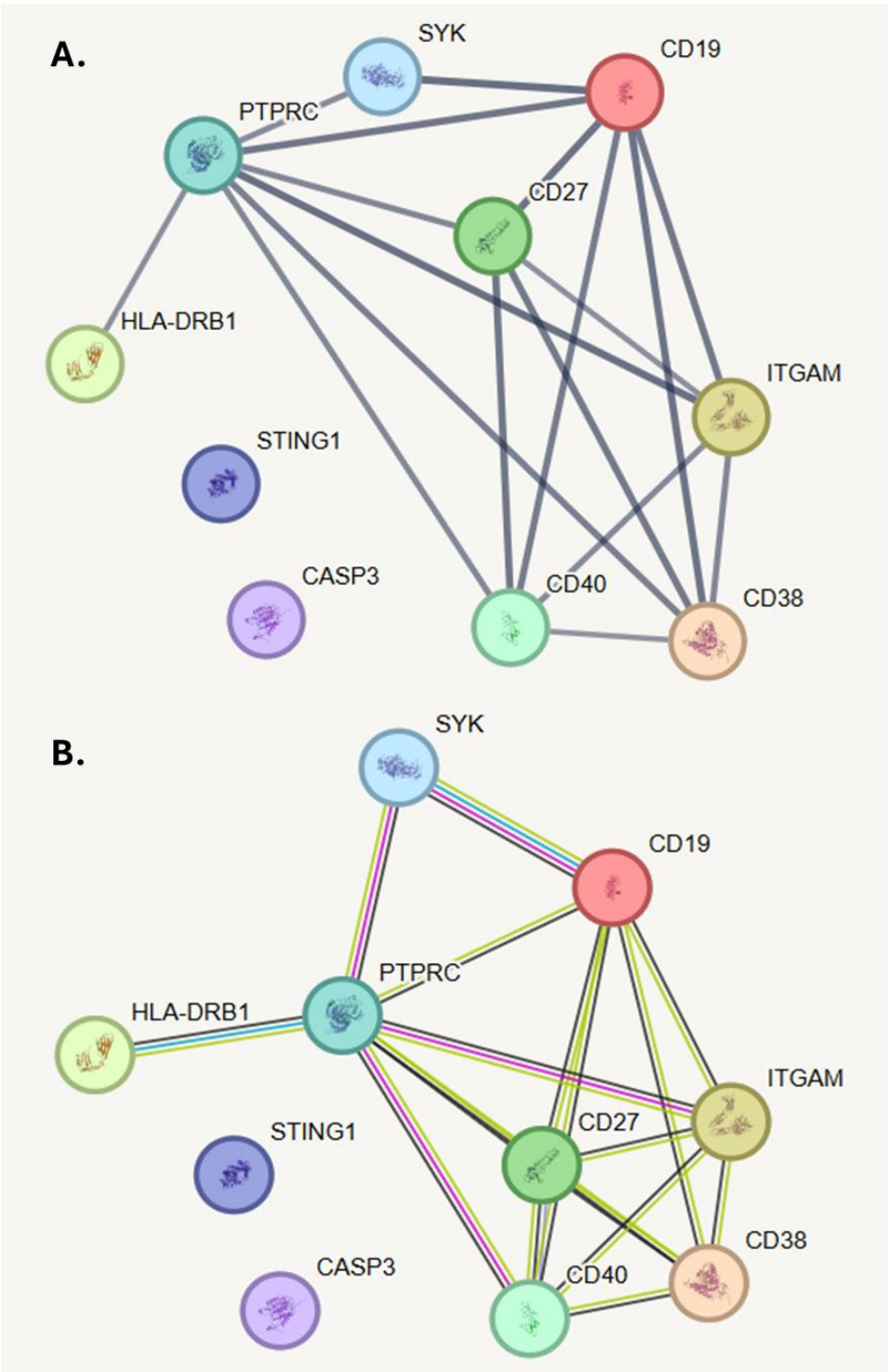
Posibles problemas y soluciones rápidas

- **Baja eficiencia de transducción:**
 - Verificar título viral y recalcular MOI.
 - Usar spinoculación.
 - Asegurar células en fase logarítmica y alta viabilidad (>95 %).
- **Alta citotoxicidad:**
 - Reducir MOI o concentración de potenciador.
 - Preferir LentiBOOST™ sobre Polybrene en MNSP primarias.
- **Expresión inconsistente:**
 - Confirmar integridad del constructo.
 - Comprobar si el promotor (MND o EF1α) es activo en el tipo celular analizado.

Notas finales

- Los sobrenadantes recolectados tras transducción no deben reutilizarse ni congelarse para retransfecciones: desechar con inactivación viral.
- Para experimentos comparativos (WT vs mutante), usar el mismo MOI y condiciones idénticas.
- Recomendando triplicados biológicos por condición para asegurar robustez de los datos.

ANEXO 8 Análisis exploratorio de enriquecimiento funcional de las proteínas moduladas por GP63 en los Linfocitos B Ramos.



C.

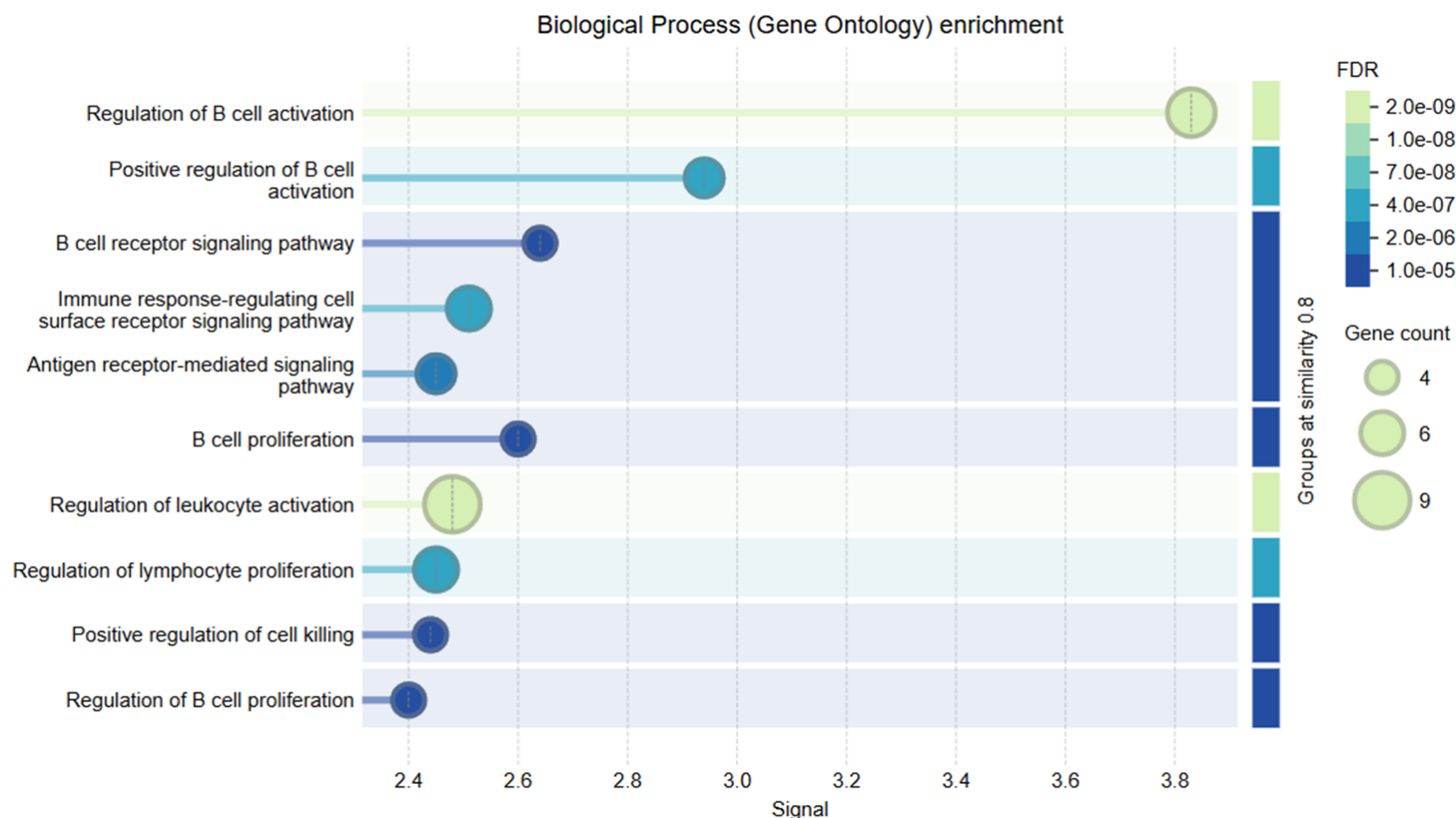


Figura 55 Análisis de enriquecimiento funcional de las proteínas moduladas por GP63 en LB.

Análisis realizado en la plataforma STRING. **A)** se observan las proteínas y sus interacciones, el grosor de las líneas representa la evidencia de la relación. Mientras más ancha, mayor interacción entre ellas. **B)** las interacciones entre proteínas según, la vecindad (verde), fusión génica (rojo), coocurrencia (azul), co-expresión (negro), demostrado en laboratorio (morado), bases de datos (celeste), minería de texto (amarillo). **C)** Ontología genética por procesos biológicos asociados a los genes de las proteínas moduladas por GP63, se resalta la categoría de regulación de la activación de los LB, tema central de este trabajo.

ANEXO 9 Certificado de Asistencia al curso: "Workshop "Animal Cell Technology: development and production of biotherapeutics".

Beca completa por la Universidad de las Naciones Unidas-Programa de Biotecnología para América Latina y el Caribe (UNU-BIOLAC). Ciudad de Santa Fe, Argentina. Octubre 31-noviembre 5 2022.



-----La que suscribe, Dra. Gabriela Micheloud, Secretaria de Posgrado de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, deja constancia que MARIA CLAUDIA BARRERA FLAQUER, Pasaporte AQ923689, asistió al curso Tecnología de células animales: desarrollo y producción de bioterapéuticos(60 hs, con examen final), dictado desde el lunes 31 de octubre al sábado 5 de noviembre del corriente año, en el marco de la carrera Doctorado en Ciencias Biológicas.-----

-----A solicitud de la interesada y a los efectos de ser presentada ante quien corresponda, se extiende la presente constancia en la ciudad de Santa Fe, el 8 de noviembre de 2022.-----

Dra. Gabriela Micheloud
Secretaria de Posgrado
Fac. de Bioquímica y Cs. Biológicas
U.N.L.

Universidad Nacional del Litoral
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas
Secretaría de Posgrado

Ciudad Universitaria.
C.C. 242 - 3000 Santa Fe
Tel./Fax.: (0342) 4575215/6 - Int. 117
posgrado@fcbi.unl.edu.ar
www.fcbi.unl.edu.ar



UNL • FACULTAD
DE BIOQUÍMICA Y
CIENCIAS BIOLÓGICAS

Tecnología de células animales: desarrollo y producción de bioterapéuticos

Resolución CD FBCB UNL N° 565/22

Modalidad Teórico-Práctico

~

Por cuanto Maria Claudia Barrera Flaquer, Pasaporte AQ923689, asistió y aprobó con calificación **Distinguido - 9 (nueve)** el curso **Tecnología de células animales: desarrollo y producción de bioterapéuticos**, realizado bajo la Dirección de la Dra. Natalia Analía Ceaglio y del Dr. Marcos Rafael Oggero Eberhardt, en el marco de la carrera Doctorado en Ciencias Biológicas de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, dictado desde el 31 de octubre al 5 de noviembre de 2022, con una carga horaria total de 60 h.

Se le extiende el presente certificado, en la ciudad de Santa Fe, el 8 de noviembre de 2022.



UNITED NATIONS
UNIVERSITY

UNU-BIOLAC

Programme for Biotechnology in
Latin America and the Caribbean



CABBIO
CENTRO LATINOAMERICANO
DE BIOTECNOLOGÍA

Dra. Gabriela Micheloud
Secretaría de Posgrado

Téc. Adriana Vidaechea
Secretaría Administrativa

Bibq. Adriana Ortolani
Decana

ANEXO 10 Certificado de beca para asistencia a pasantía internacional: Fellowship program United Nations University Biotechnology for Latin America and The Caribbean (UNU-BIOLAC).

International internship at Immunology and Biochemistry Laboratory at Universidade Federal of Minas Gerais. Belo Horizonte, MG. Brazil. Agosto 19 - noviembre 17, 2023.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Internship Certificate

27th November 2023

Subject: Internship Certificate Letter

TO WHOM IT MAY CONCERN

This is to certify that the student MARIA CLAUDIA BARRERA FLAQUER has successfully completed an internship at the Departamento de Bioquímica e Imunologia, of the Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil.

Maria Claudia was hosted by the Molecular Modeling and Drug Design Laboratory, under my supervision. She joined the laboratory on Monday, August 21, 2023 until Thursday, November 16, 2023. During her stay, Maria Claudia demonstrated self-discipline, self-motivation and enthusiasm in the development of her objectives of the research project "GP63 as a new immunomodulator in Systemic Lupus Erythematosus".

In her internship she has learned new strategies for molecular docking between proteins and analysis of protein-protein interfaces, employing programs like Cluspro and Haddock, and the webserver PDBsum, PISA, among others. This has been of vital importance for the development of her project.

Wishing her the best of luck in her future endeavors, I remain available for any questions and to provide further information.

Rafaela S. Ferreira

Prof. Rafaela Salgado Ferreira, PhD
Associate Professor
Biochemistry and Immunology Department
Universidade Federal de Minas Gerais
Av. Antônio Carlos 6627. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil 31270-901
Phone: +55 (31) 3409 3031
E-mail: rafaelasf@icb.ufmg.br, rafaelasf@gmail.com
<http://lattes.cnpq.br/7569627567234135>
ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-3324-0601>

ANEXO 11 Certificado de beca para la asistencia a pasantía internacional: Pre-doctoral Supplemental Visiting Fellow Award.

Visiting Fellow Program of National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). National Institutes of Health's (NIH).

Internship at the Laboratory of Clinical Immunology and Microbiology (LCIM) Genetic Immunology Section (GIS). Bethesda, MD, EE. UU. noviembre 2024 a marzo 2025.

	DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES	Public Health Service
		National Institutes of Health Bethesda, Maryland 20892 www.nih.gov
August 13, 2024		
Maria Barrera Flaquer		
Colombia		
Dear Ms. Barrera Flaquer:		
It is a pleasure to send you this official notification of your award as a Supplemental Pre-doc Fellow in the NIH Visiting Program. This award will enable you to gain biomedical research experience at the NIH under the sponsorship of Dr. Harry Malech, Laboratory of Clinical Immunology and Microbiology, National Institute of Allergy and Infectious Diseases. The award, however, is contingent upon approval by the Department of State and the Department of Homeland Security of your entry into the United States under all applicable immigration regulations.		
The award is effective November 04, 2024 through March 03, 2025. During your fellowship you will receive a stipend as determined by your Institute. Continuation of this fellowship is based on demonstrated progress and approval by your sponsor and Institute Director. Renewal is also contingent upon applicable immigration regulations.		
The Division of International Services is responsible for verifying your nonimmigrant status prior to the start of your award. You will receive a reminder e-mail with additional details about your check-in as we get closer to the start date.		
If your site of activity is not in close proximity to the main NIH campus in Bethesda, Maryland, please contact your Institute/Center (IC) Key Contact or Administrative Officer to initiate the remote check-in process.		
We look forward to your participation in the NIH Visiting Program and hope that you will find the experience both pleasant and rewarding.		
Sincerely,		
Candelario Zapata -S		
Digitally signed by Candelario Zapata -S Date: 2024.08.13 13:01:02 -04'00'		
Candelario Zapata Director, Division of International Services		
Enclosures cc: Dr. Harry Malech, NIAID Shonte Jackson		
NIHCA2400070		



DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES

Public Health Service

National Institutes of Health
Bethesda, Maryland 20892

March 21, 2025

Re: Verification of employment for Maria Barrera Flaquer, PreDoctoral Visiting Fellow.

To whom it may concern:

This letter is to verify that Maria Barrera Flaquer was employed by the National Institute of Health (NIH) in Bethesda, MD, as a Pre-Doctoral Visiting Fellow. The NIH is the U.S. Federal Government's focal point for health research: its mission is to generate scientific knowledge and apply that knowledge to extend healthy life and reduce the burdens of illness and disability among the American public.

Ms. Barrera Flaquer was employed by the NIH from November 4, 2024, to March 4, 2025. She was employed full-time as a Pre-Doctoral Visiting Fellow of the Genetic Immunotherapy Section (GIS) Laboratory of Clinical Immunology and Microbiology (LCIM), National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), for a period of one year in accordance with the government salary increase guidelines for his position. Ms. Barrera Flaquer conducted research at the Laboratory of LCIM, GIS at the NIAID. The research goal of the laboratory was to Study "The effect of GP63 protein on immune cells".

If you have any additional questions, please do not hesitate to contact me by phone at (240) 669-2070 or via e-mail at shonte.jackson@nih.gov.

Sincerely,

Shonte Jackson
Administrative Officer
Laboratory of Clinical Immunology and Microbiology
National Institute of Allergy and Infectious Diseases
National Institute of Health

ANEXO 12 Listado de participación en publicaciones durante el periodo académico de estudio doctoral.

- **Frequency of Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies in Patients with Systemic Lupus Erythematosus.** Evelyn Santacruz-Sandoval, Cristian C. Aragón, Ivana Nieto-Aristizábal, Ingrid Ruiz-Ordoñez, Jhoan S. Quijano, Daniela Ramírez-Castillo, Karen Mondragón M, Ivan Posso-Osorio, María Claudia Barrera, Lady J.Rios-Serna, Gabriel J.Tobón. Revista Colombiana de Reumatología, 2021; 2 April 2021. doi.org/10.1016/j.rcreu.2021.01.002
- **Association of Antiribosomal P Antibody with Neurological and Systemic Manifestations in Patients with Systemic Lupus Erythematosus in Southwestern Colombia.** Marín JD, Vargas S, Ruiz-Ordoñez I, Posso-Osorio I, Nieto-Aristizábal I, Barrera MC, Ríos-Serna LJ, Tobón GJ. J Appl Lab Med. 2021 Jun 4;jfab045. doi: 10.1093/jalm/jfab045. Online ahead of print. PMID: 34086896.
- **Expression of parathormone receptor on B-lymphocytes in Systemic Lupus Erythematosus and Sjögren's Syndrome.** Lady J Rios-Serna, Ivana Nieto-Aristizábal , Ingrid Ruiz-Ordoñez , Tatiana Mendez-Rayó , Iván Posso-Osorio , Jhon García , Erika P Navarro , María Claudia Barrera , David Aguirre-Valencia , Carlos A Cañas , Gabriel J Tobón. Rheumatology (Oxford)2021 Dec 1;60(12):5869-5872. doi: 10.1093/rheumatology/keab693.
- **Biological effects of animal venoms on the human immune system.** Zharick Avalo, María Claudia Barrera, Manuela Agudelo-Delgado, Gabriel J Tobón, Carlos A Cañas. Toxins (Basel) 2022 May 16;14(5):344. doi: 10.3390/toxins14050344. PMID: 35622591.
- **B-cell activating factor (BAFF) and its receptors' expression in pediatric nephrotic syndrome is associated with worse prognosis.** Jessica Forero-Delgadillo; Vanessa Ochoa; Jaime M Restrepo; Laura Torres-Canchala; Ivana Nieto-Aristizábal; Ingrid Ruiz-Ordoñez; Aura Sánchez; María Claudia Barrera; Carlos Andrés Jimenez; Gabriel J. Tobón. (PLOS ONE. Nov 4 2022).