



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS PSEUDOVIRALES DE ZIKV EN CÉLULAS DE  
MAMÍFERO DE FORMA ESTABLE Y EN CÉLULAS DE INSECTO**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:**

**Selene Jocelyn Uribe Romero**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dra. Laura A. Palomares  
Instituto de Biotecnología, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

**Dr. Ismael Secundino Velázquez, Instituto de Biotecnología, UNAM  
Dra. Victoria Pando Robles, Instituto Nacional de Salud Pública**

**Cuernavaca, Morelos**

**Febrero, 2020.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Dedicada a mis padres*

*Doy Gracias a Dios*

*Por brindarme la vida, sabiduría, amor y salud*

*A mis padres Alicia Romero y Roberto Uribe*

*Por su apoyo incondicional y desinteresado*

*Por su comprensión y confianza*

*Por compartir conmigo tristezas, alegrías, fracasos y éxitos*

*Por alentarme a ser mejor cada día*

*A mi hermana Lesly*

*Mi compañera en todo momento*

*Por su apoyo moral e incondicional*

*Por sus travesuras y alegría que me han alentado en el transcurso de mi vida*

*Por lo que ha sido y por lo que vendrá*

*Gracias.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Laura Alicia Palomares por permite entrar a su grupo de investigación. Gracias por su apoyo incondicional. Por ser un ejemplo a seguir, sus acciones me inspiran a aprender y a soñar más, sinceramente gracias.

Al Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez por permitirme trabajar en su grupo y por sus valiosos comentarios.

Al Dr. Claudio Prieto y Dr. Diego Fontana de la Universidad Nacional de Litoral (UNL), Argentina por permite realizar la estancia en su laboratorio, por su tiempo, paciencia y enseñanzas en el manejo de vectores lentivirales.

A mi comité Tutorial, Dra. Victoria Pando y Dr. Ismael Secundino. Les agradezco sus recomendaciones y valiosas tutorías.

A cada uno de los integrantes del jurado: Dr. Baltazar Becerril Lujan, IBT; Dr. Gerardo Corzo Burquette, IBT; Tomas David López Díaz, IBT; Dr. Ismael Bustos Jaimes, Facultad de Medicina UNAM y Ramón Gonzáles García Conde, CIDC; por aceptar revisar esta tesis y por sus valiosos comentarios.

A la Dra. Georgina Gurrola y MC Timoteo Olamendi por sus enseñanzas en la purificación de proteínas.

A los técnicos académicos del laboratorio MC Vanesa Hernández en especial a MC Ruth Pastor y MC Martha Contreras por su apoyo y enseñanzas.

A la Dra. Michelle y Dra. Mabel por sus consejos.

Al personal administrativo Biol. Larisa Campos y Lic. Karin Levy por su apoyo.

Al grupo GPR los que fueron y los que son: Violeta, Arturo, Ana, Ricardo, Víctor, Alhely, Esmeralda, Juan Carlos, Dubhe y Paz por su amistad.

Al grupo de Laboratorio de Desarrollos Biotecnológicos y de Cultivos Celulares de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB) de la UNL, especialmente a Juan Bata y Ernesto Garay por su apoyo y amistad.

A mis amigos los quemadores el Dr. Pablo, Dra. Brenda y Dra. Vanesa quienes me han apoyado y alentado en el transcurso de la licenciatura y maestría; Por su grata y sincera amistad.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la asesoría de la Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera. Investigación realizada gracias a la beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IT200418.

# ÍNDICE

1	RESUMEN.....	16
2	INTRODUCCIÓN .....	18
3	ANTECEDENTES.....	20
3.1	VIRUS ZIKA.....	20
3.2	EPIDEMIOLOGÍA .....	20
3.2.1	Prevalencia global.....	20
3.2.2	Prevalencia en México.....	22
3.3	CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DEL VIRUS ZIKA.....	23
3.4	CICLO DE REPLICACIÓN DEL VIRUS ZIKA .....	24
3.4.1	PROTEÍNA E.....	26
3.4.2	PREVENCIÓN Y CONTROL .....	27
3.5	DESARROLLO DE VACUNAS CONTRA ZIKV .....	28
3.5.1	PARTICULAS PSEUDOVIRALES.....	29
3.5.1.1	Clasificación .....	30
3.5.1.2	Sistemas de expresión utilizados para la producción de partículas pseudovirales .....	31
3.5.1.2.1	Sistema de insecto baculovirus .....	32
3.5.1.2.1.1	Componentes del sistema de célula de insecto-baculovirus (SCI-BV).....	32
3.5.1.2.1.2	Producción de proteínas en el SCI-BV .....	34
3.5.1.2.2	Células de mamífero.....	35
3.5.1.2.2.1	Líneas celulares para producir PPV .....	36
3.5.1.2.2.2	Transferencia del material genético.....	37
3.5.1.2.3	Vectores lentivirales .....	38
3.5.2	Estrategias de producción de PPV de flavivirus.....	40
3.5.3	PPV de ZIKV.....	43
4	JUSTIFICACIÓN .....	44
5	HIPÓTESIS .....	44
6	OBJETIVOS .....	45
6.1	OBJETIVO GENERAL .....	45
6.2	OBJETIVOS PARTICULARES .....	45
7	METODOLOGÍA.....	46
7.1	SÍNTESIS.....	46
7.1.1	Secuencia ss-M-E (minus TM) ZIKV, (TM) JEV.....	46
7.1.2	Oligonucleótidos.....	46
7.1.3	Secuenciación .....	47
7.2	TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	47
7.2.1	Cepas y soluciones.....	47
7.2.2	Amplificación por PCR .....	48
7.2.3	Corte con enzimas de restricción .....	48
7.2.4	Reacción de ligación .....	49
7.2.5	Transformación de células quimiocompetentes .....	49
7.2.6	Mini-preparación de DNA plasmídico.....	49
7.2.7	Maxi preparación de DNA plasmídico .....	49



7.3	PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS PSEUDOVIRALES .....	50
7.3.1	Líneas celulares.....	50
7.3.2	Medios de cultivo y suplementos.....	50
7.3.3	Criopreservación de las líneas y descongelación.....	50
7.3.4	Sistema de insecto baculovirus .....	51
7.3.4.1	Generación del bÁcmido recombinante .....	51
7.3.4.2	Análisis de bÁcmidos recombinantes por PCR.....	52
7.3.4.3	Cultivo de células Sf9 .....	52
7.3.4.4	Transfección de células Sf9 con bÁcmidos recombinantes .....	53
7.3.4.5	Ensayo en placa para aislar placas de baculovirus recombinantes .....	53
7.3.4.6	Generación de stocks de baculovirus recombinantes a partir de las placas aisladas ..	54
7.3.4.7	Titulación de stocks de baculovirus .....	54
7.3.4.8	Cinéticas de producción de PPV ZIKV en células Sf9 .....	56
7.3.5	Desarrollo de línea celulares recombinantes en células de mamífero .....	56
7.3.5.1	Cultivo de HEK-293/ HEK-293T17 .....	56
7.3.5.2	Determinación de la dosis mínima de antibiótico .....	57
7.3.5.3	Transfección transitoria .....	57
7.3.5.4	Generación de la línea estable por el método tradicional .....	57
7.3.5.5	Ensamblaje del lentivirus .....	58
7.3.5.6	Cosecha y concentración de partículas lentivirales.....	58
7.3.5.7	Determinación del título de lentivirus por ELISA.....	59
7.3.5.8	Ensayo de ELISA .....	60
7.3.5.9	Cálculo del título viral .....	61
7.3.5.10	Determinación del título viral por citometría de flujo.....	61
7.3.5.11	Transducción de las células HEK-293T/17 .....	62
7.3.5.12	Selección de las células HEK-293 T/17 transducidas .....	62
7.3.5.13	Generación de clones.....	63
7.3.6	Metodología analítica para la caracterización de PPV-ZIKV.....	64
7.3.6.1	Purificación de PPV ZIKV por ultra centrifugación.....	64
7.3.6.2	Construcción de una resina de afinidad de sepharosa 4B AcM EDE1 C8 .....	64
7.3.6.3	Reacción de acoplamiento.....	65
7.3.6.4	Estandarización de la purificación de PPV con resina de afinidad C8 anti-EDE-E ZIKV.....	68
7.3.6.5	Tinción de plata.....	67
7.3.6.6	Western blot .....	67
7.3.6.7	Dot blot .....	68
7.3.6.8	Ensayo de BCA .....	69
7.3.6.9	Microscopía electrónica de transmisión.....	69
8	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	70
8.1	CONSTRUCCIÓN DE QUÍMERA.....	70
8.1.1	Diseño .....	70
8.1.2	Verificación de la secuencia .....	73
8.2	PRODUCCIÓN DE PPV ZIKV EN EL SISTEMA DE INSECTO BACULOVIRUS.....	75
8.2.1	Clonación en el vector donador.....	75
8.2.2	Generación y análisis del bÁcmido recombinante.....	76
8.2.3	Transfección de células de insecto Sf9 y producción de baculovirus recombinante .....	79
8.2.4	Cinéticas de producción de ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM) en las células de insecto Sf9 .....	82
8.2.5	Purificación de las PPV ZIKV .....	86

8.2.5.1	Purificación por intercambio aniónico.....	86
8.2.5.2	Purificación por afinidad.....	87
8.3	PRODUCCIÓN DE PPV ZIKV EN CÉLULAS DE MAMÍFERO.....	90
8.3.1	Generación de una línea estable por el método tradicional.....	90
8.3.1.1	Determinación de la dosis mínima de antibiótico para las células HEK-293.....	90
8.3.1.2	Transfección y selección de la línea estable.....	91
8.3.2	Generación de la línea estable con vector lentiviral.....	95
8.3.2.1	Generación del vector de transferencia.....	95
8.3.2.2	Ensamblado de lentivirus de tercera generación.....	97
8.3.2.3	Cuantificación de partículas lentivirales.....	99
8.3.2.4	Transducción con PL y selección de células HEK-293 T/17.....	101
8.3.2.5	Análisis de la expresión del transgén de ZIKV.....	106
8.3.2.6	Generación de clonas productoras de PPV ZIKV.....	112
8.3.3	Caracterización y purificación de PPV ZIKV.....	114
9	CONCLUSIONES.....	117
10	PERSPECTIVAS.....	118
11	BIBLIOGRAFÍA.....	119
12	APENDÍCE I.....	124
13	APÉNDICE II.....	128

## ABREVIATURAS

<b>1PL</b>	Partículas lentivirales ensambladas con PEI
<b>2PL</b>	Partículas lentivirales ensambladas con lipofectamina
<b>AcM</b>	Anticuerpo monoclonal
<b>AcMNPV</b>	<i>Autographa californica</i>
<b>aph</b>	Gen de resistencia a neomicina
<b>Bac GFP</b>	Bac GFP Baculovirus recombinante con el gen de proteína reportera GFP
<b>Bac PPV ZIKV</b>	Baculovirus recombinante con el gen ss, ZIKV M-E (minus TM), JEV E(TM)
<b>BEV</b>	Vector de expresión
<b>BV</b>	Virión gemado
<b>C</b>	Proteína de cápside
<b>CCI</b>	Concentración celular al tiempo de infección
<b>CDC</b>	Centro para el Control y Prevención de Enfermedades
<b>CNBr</b>	Bromuro de cianógeno
<b>DENV</b>	Virus de dengue
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>DMS</b>	Dimetil-sulfóxido
<b>E</b>	Glicoproteína de envoltura
<b>FL</b>	Loop de fusión
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>GP64</b>	Glicoproteína de envoltura de baculovirus
<b>HEK-293</b>	Células embrionarias de riñón de humano
<b>HEK-293T/17</b>	Línea derivada de HEK-293
<b>IN</b>	Integrasa
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-1 tiogalactopiranosido
<b>JEV</b>	Virus de encefalitis japonesa
<b>kb</b>	Kilobases
<b>LTR</b>	Secuencias largas terminales
<b>LVs</b>	Vectores lentivirales
<b>MDI</b>	Multiplicidad de infección
<b>MMT</b>	Bromuro 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2-5difenil tetrazolio
<b>NHEJ</b>	Unión de extremos no homólogos
<b>NT</b>	Número de transducciones
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OV</b>	Virión ocluido
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PEI</b>	Polietilamina
<b>PL GFP</b>	Partículas lentivirales con el gen de GFP
<b>PL</b>	Partículas lentivirales
<b>PL ZIKV</b>	Partículas lentivirales con el gen de ss, ZIKV M-E(minus TM), JEV E(TM)
<b>pLV</b>	Vector de transferencia
<b>PPV</b>	Partículas pseudovirales
<b>PrM</b>	Proteína pre-membrana

<b>M</b>	Proteína de membrana
<b>MET</b>	Microscopia electrónica de transmisión
<b>RT</b>	Transcriptasa reversa
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SBG</b>	Síndrome de Guillain-Barré
<b>SCI-BV</b>	Sistema de Célula de Insecto-Baculovirus
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>ss</b>	Secuencia señal de JEV
<b>ss, ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM)</b>	ss, M de ZIKV, tres ectodominios de E ZIKV sin el TM y TM de la proteína E del JEV
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TDC</b>	Tiempo de cosecha
<b>TM</b>	Dominio trans membranar
<b>tm</b>	Temperatura de fusión
<b>U</b>	Unidades enzimáticas
<b>UFP</b>	Unidades formadoras de placa
<b>UT</b>	Unidades de transducción
<b>VC</b>	Volumen de columna
<b>xg</b>	Gravedades

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Áreas con riesgo de virus Zika en el mundo.	21
<b>Figura 2.</b> Casos confirmados por enfermedad del ZIKV del 2015 hasta la semana 31 del 2019.	22
<b>Figura 3.</b> Flavivirus.	22
<b>Figura 4.</b> Ciclo del virus Zika.	25
<b>Figura 5.</b> Criomicroscopía electrónica de la estructura del virus ZIKV y estructura de la proteína E.	25
<b>Figura 6.</b> Vacunas candidas contra ZIKV.	28
<b>Figura 7.</b> Clasificación de PPV.	30
<b>Figura 8.</b> Productividades logradas de PPV estructuralmente distintas utilizando diversos sistemas de expresión.	31
<b>Figura 9.</b> Ciclo de vida del baculovirus.	33
<b>Figura 10.</b> Producción de proteínas recombinantes en el SCI-BV utilizando el sistema de expresión Bac-to-Bac®.	35
<b>Figura 11.</b> Representación esquemática de los vectores lentivirales de tercera generación.	39
<b>Figura 12.</b> Producción de proteínas recombinantes mediante vectores lentivirales.	40
<b>Figura 13.</b> Estrategia general para la construcción de PPV de flavivirus.	41
<b>Figura 14.</b> Esquema de la secuencia ss, ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM).	46
<b>Figura 15.</b> Esquema del fundamento del kit QuickTiter™ Lentivirus Titer.	59
<b>Figura 16.</b> Esquema de reacción de resina activada con bromuro de cianógeno y aminas primarias.	65
<b>Figura 17.</b> Predicción de regiones transmembranales de la secuencia M-E ZIKV en el programa TMHMM.	71
<b>Figura 18.</b> Predicción de regiones transmembranales de la secuencia E JEV en el programa TMHMM.	71
<b>Figura 19.</b> Análisis de digestión enzimática del plásmido pcDNA 3.1 (+) ss, ZIKV M-E minus TM, JEV E (TM) por gel de agarosa al 1%.	73
<b>Figura 20.</b> Análisis por enzimas de restricción del ss, ZIKV M-E (minus), JEV E (TM) y del vector pFastBac1.	75
<b>Figura 21.</b> Análisis de amplificación de ss, ZIKV M-E (minus TM) JEV (TM) por PCR de colonia del producto de ligación, en gel de agarosa al 1%.	75
<b>Figura 22.</b> Análisis por corte de enzimas de restricción del DNA plasmídico pFastBac1-ss, ZIKV M-E (minus TM), JEV (TM) en gel de agarosa al 1%.	76
<b>Figura 23.</b> Diagrama de inserción del gen de interés para la generación del báculo recombinante.	77
<b>Figura 24.</b> Análisis por PCR de colonia del báculo recombinante en gel de agarosa al 1 %.	77
<b>Figura 25.</b> Análisis por PCR de ss, ZIKV M-E (TM), JEV (TM) a partir del báculo recombinante en gel de agarosa al 1%.	78
<b>Figura 26.</b> Análisis por PCR de la dirección del transgén en el báculo recombinante en gel de agarosa al 1%.	78
<b>Figura 27.</b> Análisis por Western blot anti-proteína E ZIKV de sobrenadante y pellet de células Sf9 transfectadas.	79

<b>Figura 28.</b> Análisis por Western blot anti-proteína E ZIKV en la selección del baculovirus recombinante.	80
<b>Figura 29.</b> Cinética de células Sf9 infectadas a MDI de 1 y 0.1 ufp/cel de los Bac PPV ZIKV, Bac GFP y células sin infectar.	83
<b>Figura 30.</b> Análisis por Western blot anti-proteína E ZIKV de las cinéticas de infección.	85
<b>Figura 31.</b> Análisis Western blot anti-proteína E ZIKV y tinción de plata de las PPV de ZIKV concentradas por colchón de sacarosa de las cinéticas de infección.	85
<b>Figura 32.</b> Análisis por SDS-PAGE revelado con tinción de plata de las PPV ZIKV purificadas por intercambio aniónico.	87
<b>Figura 33.</b> Análisis por Dot blot anti-EDE ZIKV y SDS-PAGE revelado con tinción de plata de las PPV purificadas por afinidad.	88
<b>Figura 34.</b> Análisis por tinción negativa en el microscopio de transmisión electrónica a diferentes magnificaciones (k).	89
<b>Figura 35.</b> Determinación de la dosis mínima de neomicina para las células HEK-293.	91
<b>Figura 36.</b> Western blot anti-E ZIKV de la transfección de células HEK-293 con el plásmido pcDNA 3.1-ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM).	92
<b>Figura 37.</b> Selección con neomicina de las células HEK-293 transfectadas con pcDNA 3.1 (+) ZIKV M-E (minus TM), JEV (TM).	93
<b>Figura 38.</b> Western blot anti-E ZIKV del sobrenadante de las células HEK-293 seleccionadas con neomicina.	94
<b>Figura 39.</b> Análisis del plásmido pLV PLK EF-1 $\alpha$ y pLV PLK por enzimas de restricción en gel de agarosa al 1%.	96
<b>Figura 40.</b> Análisis por PCR de colonia de la reacción de ligación de pLV PLK EF-1 $\alpha$ y el inserto en gel de agarosa al 1%.	96
<b>Figura 41.</b> Análisis por enzimas de restricción del vector pLV PLK EF-1 $\alpha$ en gel de agarosa al 1%.	97
<b>Figura 42.</b> Control de transfección con PEI y lipofectamina de las células HEK-293T/17.	98
<b>Figura 43.</b> Células HEK-293 T/17 transducidas con LP GFP durante 96 h.	100
<b>Figura 44.</b> Selección con antibiótico de las células HEK-293 T/17 transducidas con 1PL ZIKV.	103
<b>Figura 45.</b> Células HEK-293T/17 transducidas con 2PL GFP (control positivo).	104
<b>Figura 46.</b> Selección con antibiótico de las células HEK-293 T/17 silvestres, transducidas 2PL ZIKV y 2PL GFP.	105
<b>Figura 47.</b> Evaluación de la expresión de ZIKV M-E (minus TM, JEV E(TM)) en las células transducidas y seleccionadas a diferentes concentraciones de antibiótico por citometría de flujo.	107
<b>Figura 48.</b> Análisis por citometría de flujo del porcentaje de células que expresan la proteína ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM) de las células transducidas y seleccionadas a diferentes concentraciones de antibiótico.	108
<b>Figura 49.</b> Evaluación de la expresión de ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM) de la línea a) 1PL2T y b) 2PL1T a diferentes concentraciones de antibiótico por citometría de flujo.	109

<b>Figura 50.</b> Análisis por citometría de flujo del porcentaje de células que expresan la proteína ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM) del grupo 2LP1T, cada 8 días después de su selección.	110
<b>Figura 51.</b> Análisis por Western blot anti-proteína E ZIKV del sobrenadante concentrado por colchón de sacarosa del grupo de HEK-293T/17 2LP1T seleccionadas a diferentes concentraciones de puromicina.	111
<b>Figura 52.</b> Análisis por Western blot anti-proteína E ZIKV de la producción del transgén ZIKV E-M (minus TM) JEV E (TM) a través de pases consecutivos del grupo de HEK-293T/17 2LP1T con 3 µg/mL del agente de selección.	112
<b>Figura 53.</b> Análisis por Dot blot anti-proteína E ZIKV del sobrenadante de la dilución clonal del grupo de HEK 293T/17 2PL1T seleccionada con 3 µg de puromicina.	113
<b>Figura 54.</b> Tinción negativa de PPV de M-E (minus TM) ZIKV, TM JEV producidas en el sobrenadante de HEK-293T/17 2LP1T observadas en TEM a diferentes magnificaciones (k).	114
<b>Figura 55.</b> Análisis por Dot blot anti-EDE ZIKV de las fracciones de purificación por afinidad de PPV ZIKV producidas por las HEK293T/17 2PL1T.	115
<b>Figura 56.</b> Análisis por Dot blot anti-EDE ZIKV de las fracciones de purificación por afinidad de PPV ZIKV producidas por las HEK293T/17 2PL1T.	115
<b>Figura 57.</b> Análisis por gel SDS-PAGE revelado con tinción de plata de las fracciones de elución de la purificación de PPV ZIKV producidas en HEK293T/17.	116

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Proteínas principales de <i>flavivirus</i> y su función.	24
<b>Tabla 2.</b> PPV de flavivirus (DENV).	42
<b>Tabla 3.</b> PPV recombinantes de ZIKV.	43
<b>Tabla 4.</b> Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.	47
<b>Tabla 5.</b> Componentes de PCR.	48
<b>Tabla 6.</b> Protocolo PCR.	48
<b>Tabla 7.</b> Componentes de PCR.	52
<b>Tabla 8.</b> Protocolo PCR.	52
<b>Tabla 9.</b> Purificación de PPV con la resina Sepharosa 4B – AcM EDE1 C8.	66
<b>Tabla 10.</b> Títulos de baculovirus.	81
<b>Tabla 11.</b> Purificación de PPV con la resina Sepharosa 4B AcM EDE1 C8.	88
<b>Tabla 12.</b> Cuantificación de partículas lentivirales por ELISA.	99
<b>Tabla 13.</b> Grupos de HEK 293T /17.	106
<b>Tabla 14.</b> Líneas celulares productoras de PPV ZIKV obtenidas de una o dos células al realizar la dilución limitante.	113
<b>Tabla 15.</b> Purificación de PPV con la resina Sepharosa 4B AcM EDE1 C8.	115



## 1 RESUMEN

La infección por virus Zika (ZIKV) típicamente causa un síndrome febril leve, sin embargo, puede causar trastornos neurológicos y significativos defectos congénitos por lo cual ZIKV plantea un gran desafío público. Hasta el momento no hay un tratamiento o vacuna disponible, por lo que el desarrollo de una vacuna segura y eficaz es primordial. Se han propuesto varias vacunas candidatas, una alternativa es el uso de partículas pseudovirales (PPV), en donde los antígenos de superficie se expresan de manera recombinante y se ensamblan en una conformación ordenada como una partícula carente de material genético. Las PPV son capaces de generar una potente y equilibrada respuesta inmune. La partícula de ZIKV es envuelta y está conformada por tres proteínas estructurales: envoltura (E), pre-membrana y de cápside. El blanco primario de anticuerpos neutralizantes contra ZIKV es la glicoproteína E, la que posee un sitio de N-glicosilación en algunas cepas de ZIKV. El perfil de N-glicosilación de una proteína está determinado tanto por la proteína misma, como por la célula hospedera productora. El ZIKV tiene como hospedero tanto al humano como al insecto, y se espera que los patrones de N-glicosilación de la proteína E producida por cada hospedero sea diferente. En este trabajo se decidió producir PPV de ZIKV en células de insecto y humanas con la finalidad de evaluar el patrón de N-glicosilación y la producción en ambos tipos celulares. Para lograr esto, se diseñó una químera ss- M-E (minus TM) ZIKV, (TM) JEV para la producción de PPV de Zika en el sobrenadante de las células de mamífero y de insecto. En la primera parte del trabajo, se construyó un baculovirus recombinante que contiene la secuencia de la químera para su expresión en células de insecto. Posteriormente, se realizaron cinéticas de infección para determinar las condiciones óptimas que resultarán en un mayor rendimiento de producción de proteína recombinante. La segunda parte consistió en la expresión de la químera en las células de mamífero. Dos estrategias fueron utilizadas, la primera se basó en seleccionar un grupo de células HEK-293 transfectadas con el plásmido pcDNA 3.1 que contenía la secuencia de la químera. La segunda consistió en el uso de vectores lentivirales de tercera generación como sistema de transferencia del material genético. Diferentes grupos de células HEK-293T/17 fueron seleccionados y analizados por citometría de flujo. Luego con la finalidad de incrementar la producción de PPV de ZIKV, se generaron clones estables productoras de PPV. Por

último, se llevó a cabo la purificación y la caracterización de las PPV obtenidas. Se observaron PPV esféricas, con envoltura y con un diámetro promedio de  $50 \pm 20$  nm para tanto para las PPV producidas por las células de insecto como las PPV expresadaa en las las células de mamífero. Así, se desarrollaron estrategias para la producción eficiente de PPV en ambos sistemas, que pueden ser utilizados para investigaciones posteriores.

## 2 INTRODUCCIÓN

El virus Zika (ZIKV) es un arbovirus, virus transmitidos por artrópodos, emergente de la familia *Flaviviridae*, en la que se incluyen virus patógenos que afectan al humano, como el virus dengue (DENV), virus de la fiebre amarilla, virus del Nilo occidental (WNV) y virus de la encefalitis japonesa (JEV) (Lindenbach *et al.* 2013). Hasta hace poco, los brotes de ZIKV eran esporádicos y autolimitados, por lo que la infección por ZIKV permaneció relativamente menos estudiada en vista de su bajo número de casos y bajo impacto clínico en comparación con otros arbovirus. Sin embargo, la enfermedad tomó importancia cuando en Brasil, centro de epidemia de ZIKV en 2016, los recién nacidos de madres infectadas mostraron secuelas neurológicas y microcefalia. En México, la Secretaría de Salud reportó 19,955 casos autóctonos confirmados de enfermedad por ZIKV desde 2015 hasta agosto 2019 (Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedad por virus del Zika). Actualmente, la infección por ZIKV es un grave problema de salud, ya que hasta el momento no hay vacuna. Desde el 2016 hasta la fecha se han propuesto vacunas candidatas contra el ZIKV basadas en virus inactivos, DNA y mRNA, que inducen inmunogenicidad y protección en ratones y primates no humanos (Laroca *et al.*, 2016; Tebas *et al.*, 2017; Richner *et al.*, 2017; Chahal *et al.*, 2017). Mientras tanto, se siguen investigando múltiples plataformas para la generación de vacunas contra el ZIKV capaces de inducir una respuesta eficiente humoral y celular. Una alternativa es el uso de partículas pseudovirales en donde los antígenos de superficie del virus se expresan de manera recombinante y se autoensamblan en una partícula.

El genoma del virus Zika (ZIKV) codifica para tres proteínas estructurales, de las cuales las proteínas prM y E se encuentran en la superficie. La proteína E es el blanco primario de anticuerpos neutralizantes y tiene un único sitio de glicosilación en algunas cepas virales. El patrón de N-glicosilación de las proteínas depende de la proteína misma y del organismo donde se exprese, y ya que el ZIKV tiene como hospedero tanto a mamíferos como a insectos, se espera que tenga un patrón de N-glicosilación distinto. Los insectos sintetizan glicanos con manosa terminal y los mamíferos glicanos complejos (Schachter, 2009). La N-glicosilación facilita el plegamiento apropiado y el tráfico celular de proteínas virales mediante el reclutamiento y activación de chaperonas (Land *et al.*, 2001; Slater *et*

*al.*, 2004), y participa en el proceso de infección viral al permitir la interacción con el receptor o al enmascarar a la proteína, evadiendo así el reconocimiento del virus por el sistema inmune del huésped (Vigerust *et al.*, 2007). Sin embargo, en la infección por ZIKV, no se sabe si la glicosilación diferencial, insecto-mamífero, de la glicoproteína E del virus de ZIKV tiene algún impacto en la respuesta inmune. Debido a esto, el presente trabajo busca en primera instancia diseñar y producir partículas pseudovirales de Zika en el sobrenadante de células de insecto y mamífero, ambos huéspedes de ZIKV.

### **3 ANTECEDENTES**

#### **3.1 VIRUS ZIKA**

El virus Zika (ZIKV) es un arbovirus transmitido a humanos por la picadura del mosquito *Aedes aegypti* infectado, desarrollándose una enfermedad conocida como fiebre de Zika. La infección por ZIKV es sintomática en sólo el 20 al 25% de los casos. Los síntomas perduran de 4 a 7 días e incluyen fiebre transitoria, artritis, conjuntivitis no purulenta y, en menor frecuencia, mialgia, dolor de cabeza, edema y vómito. Varios estudios han mostrado que la infección por ZIKV es un desencadenante notable transitorio del síndrome de Guillain-Barré (SGB), una enfermedad autoinmune que ataca al sistema nervioso periférico, causando atrofia muscular y parálisis e incluso la muerte (Song *et al.*, 2016).

Adicionalmente a la transmisión por mosquito, el ZIKV puede ser transmitido por vía sexual, vertical, transfusión sanguínea, lactancia materna y a través del contacto directo con la piel o las mucosas (Song *et al.*, 2016). La transmisión por vector y vertical de madre a feto conduce a defectos congénitos como microcefalia, convulsiones, desproporción facial, anomalías oculares y pérdida de audición. El principal desorden del neurodesarrollo debido a la infección por ZIKV es la microcefalia, una condición en la cual se reduce el tamaño del cerebro, hay deterioro de la proliferación celular y muerte de las células progenitoras corticales (Karkhah *et al.*, 2018). La infección por ZIKV en el primer trimestre de embarazo incrementa la probabilidad del desarrollo de microcefalia, pero se han reportado casos de neonatos con microcefalia de mujeres infectadas hasta el tercer trimestre de embarazo.

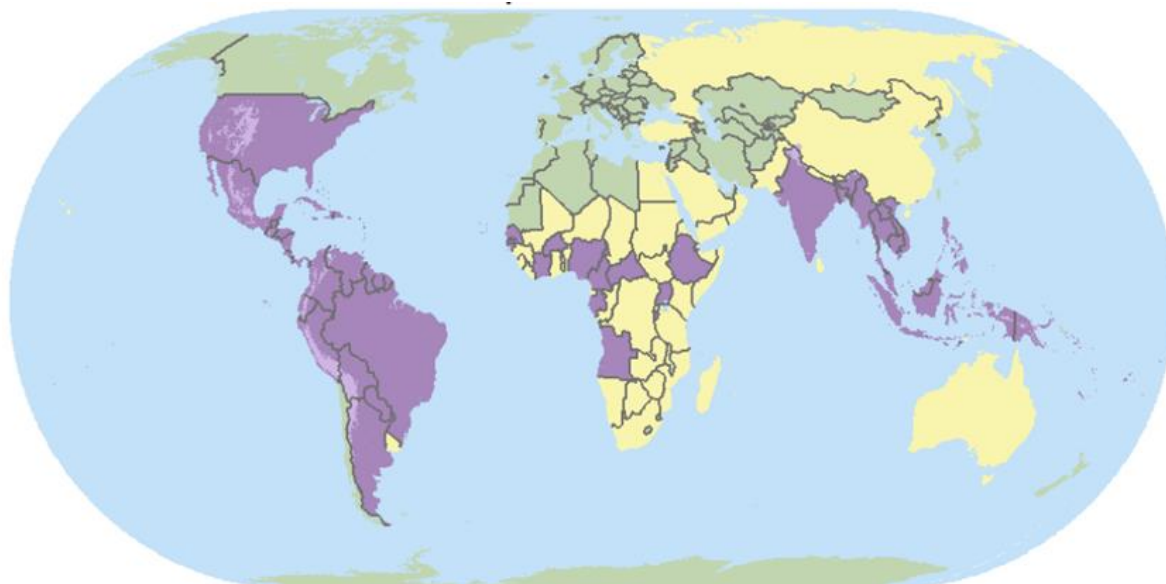
#### **3.2 EPIDEMIOLOGÍA**

##### **3.2.1 Prevalencia global**

Se han reportado brotes de infección por ZIKV en África, Sureste de Asia, islas del Pacífico y recientemente en el Caribe y América (Figura 1) (Song *et al.*, 2017). Actualmente, hay 2 linajes reconocidos de ZIKV, africano y asiático. Las cepas que circulan actualmente en el hemisferio occidental parecen ser derivadas de este último. La primera infección por Zika en humano fue reportada en Nigeria en 1952, manteniéndose

esporádica y auto limitada por casi 70 años. El primer brote masivo de ZIKV fuera de África y Asia ocurrió en 2007 en la Isla Yap, Micronesia, con 5,000 individuos infectados de los 6,700 pobladores totales (Duffi *et al.*, 2009). En el 2015, Brasil fue el primer país del continente americano con 440,000–1,300,000 infecciones por Zika (Hennessey *et al.*, 2016). Además, el Centro de Operaciones de Emergencia en Salud Pública sobre Microcefalia reportó 2366 casos confirmados por infección de ZIKV (COES, 2016).

El riesgo de malformaciones congénitas durante el embarazo debidas a la infección sigue siendo desconocido, sin embargo, se estima que entre el 5-15% de los bebés de mujeres infectadas con ZIKV presentan complicaciones relacionadas a la infección con ZIKV, mientras que el riesgo de SGB se estima de 24 casos por 100 000 infecciones por ZIKV, particularmente en áreas donde la infección es epidémica (Massad *et al.*, 2016).



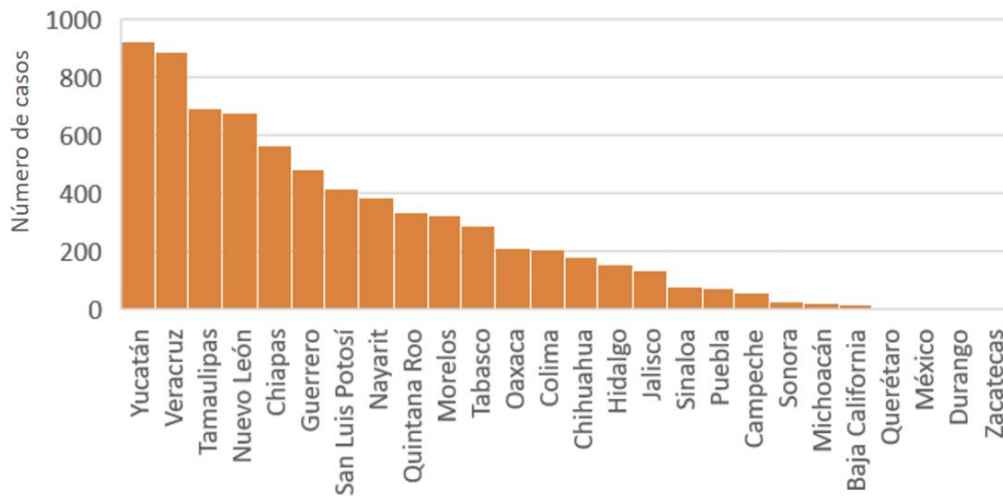
**Figura 1.** Áreas con riesgo de virus Zika en el mundo. Modificado de CDC (Center for Disease Control and Prevention, 2019).

- |  |  |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li><span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #800080; margin-right: 5px;"></span> Territorio que ha reportado casos con ZIKV<sup>1</sup> (en el pasado y recientemente)</li> <li><span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #C080F0; margin-right: 5px;"></span> Área con aparición de infección por ZIKV debido a una gran elevación (arriba 6500 pies/2000m<sup>2</sup>)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li><span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #FFFF00; margin-right: 5px;"></span> Territorio con mosquitos <i>Aedes aegypti</i> pero sin casos reportados</li> <li><span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #90EE90; margin-right: 5px;"></span> Territorio sin mosquitos que propaguen ZIKV</li> </ul> <p><sup>1</sup>Localmente adquirido</p> |
|--|--|

En tan solo dos años, el ZIKV se extendió a 48 países y territorios de América. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud y la Organización Panamericana de la Salud (PHAO/WHO/PLISA 2019), existen 492, 580 casos confirmados por virus Zika y 2311 casos con síndrome congénito asociado a ZIKV desde el 2015 al 2019.

### 3.2.2 Prevalencia en México

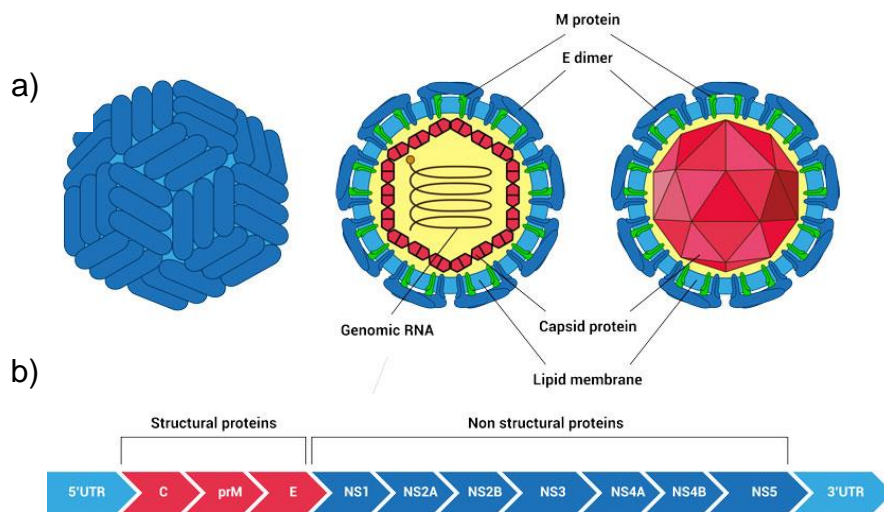
En México, el 21 de octubre de 2015 se identificó por primera vez un caso importado de Colombia por enfermedad por ZIKV en el estado de Querétaro (Díaz *et al.*, 2016). En noviembre del mismo año, se confirmaron los dos primeros casos autóctonos de la enfermedad por ZIKV en Nuevo León y Chiapas. Posteriormente, el número de casos aumentó drásticamente a 13200 casos en la semana número 27 a 47 del 2016. La Secretaría de Salud ha reportado 19 955 casos autóctonos confirmados de enfermedad por ZIKV desde 2015 hasta agosto 2019, de los cuales 7122 casos corresponden a mujeres embarazadas. El estado con mayor número de casos confirmados es Yucatán, con 2991 casos, seguido de Veracruz con 2251 casos (SINAVE/DGE/SS) (Figura 2).



**Figura 2.** Casos confirmados por enfermedad del ZIKV del 2015 hasta la semana 31 del 2019. FUENTE: SINAVE/DGE/SS: Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedad por virus del Zika.

### 3.3 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DEL VIRUS ZIKA

El ZIKV pertenece a la familia *Flaviridae* y género *Flavivirus*. El ZIKV, como otros flavivirus, tiene envoltura y forma icosaédrica (Figura 3). Su material genético consiste en una cadena de ARN de polaridad positiva. El ZIKV tiene un tamaño de 50 nm de diámetro, con un genoma de aproximadamente 11kb flanqueado por dos regiones no codificantes (5'UTR y 3'UTR). El genoma consiste en un único marco de lectura abierto que codifica para una poliproteína que es procesada en proteínas estructurales: cápside (C), glicoproteína (E) y pre-membrana (prM), y proteínas no estructurales (NS): NS1, 2A, 2B, 3, 4A, 4B y 5. Las proteínas no estructurales están involucradas en la replicación, ensamblaje y en la respuesta inmune innata del hospedero (Lindenbach *et al.*, 2013). En la tabla 1 se resumen las funciones clave y los efectos en el huésped de las proteínas de los flavivirus (DENV, JEV), que pueden ser extrapoladas de forma general para ZIKV ya que hasta el momento están en estudio.



**Figura 3.** Flavivirus. a) Estructura: Vista exterior, Corte transversal, Corte transversal manteniendo la nucleocápside intacta. b) Estructura del genoma de los flavivirus (Tomada de Amsbio 2013).

El ZIKV está compuesto por múltiples copias de proteína C cubierta por 180 copias de glicoproteína E y 180 de la proteína asociada a membrana (M), ancladas a una bicapa lipídica derivada de las células del huésped a través de sus regiones transmembranales.



La proteína E se encuentra en la superficie, mientras que la proteína M se encuentra bajo la capa de proteína E (Kostyuchenko *et al.*, 2016).

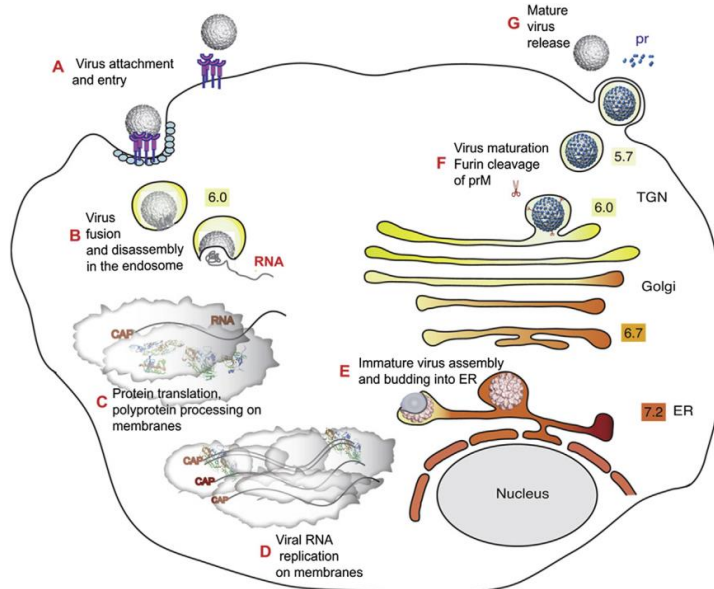
**Tabla 1.** Proteínas principales de *flavivirus* y su función. Adaptado de Wang *et al.*, (2016).

Proteínas	Función	Efectos posibles en el huésped
Cápside	Unión del RNA para formar la cápside	
Membrana	Estabilización, asistencia de plegamiento y secreción de la proteína E	Los anticuerpos hacia la prM aumentan la infectividad de los viriones inmaduros
Envoltura	Unión al receptor, fusión de las membranas viral y celular	
NS1	Replicación viral, interviene en la maduración del virón.	Modula la señalización del sistema inmune innato, posible daño a plaquetas y células endoteliales a través de anticuerpos anti-NS1
NS2A	Síntesis de RNA y ensamblaje viral	Antagonista de interferón I; induce apoptosis de la célula huésped
NS2B	Función de serin proteasa en conjunto con NS3	
NS3	Complejo con NS2B para funcionar como serin proteasa; posee actividad de RNA helicasa y trifosfatasa	Induce apoptosis de la célula huésped y modula los micro-RNA del huésped
NS4A	Replicación de RNA	Bloquea la señal de interferón I; protege a la célula huésped de la muerte durante la infección
NS4B	Replicación de RNA	Bloquea la señal de interferón tipo 1 y RNA de interferencia, modula los gránulos de estrés de la célula huésped
NS5	Actividad metil transferasa y RNA guaniltransferasa, encapuchamiento y síntesis de RNA, RNA polimerasa dependiente de RNA	Bloquea la señal de interferón I

### 3.4 CICLO DE REPLICACIÓN DEL VIRUS ZIKA

Un mosquito infectado por ZIKV, al picar al huésped, deposita su saliva en la epidermis y la dermis, resultando en la infección de queratinocitos, células de Langerhans (células dendríticas de la epidermis) y fibroblastos. La entrada de ZIKV es mediada por receptores tipo lectina, como el receptor de manosa y DC-SIGN. También reconoce otros receptores

celulares como AXL, Tyro 3 y, en menor grado, TIM-1, presentes en las células de la placenta y de la corteza cerebral en desarrollo (Retallack *et al.*, 2016; Tabata *et al.*, 2016). Después del reconocimiento y unión al receptor, el virus es endocitado, aunque también se ha reportado su internalización por micropinocitosis. Dentro de los endosomas, la glicoproteína E experimenta cambios estructurales debido al bajo pH, que permiten su fusión con la membrana del endosoma, liberando la nucleocápside en el citoplasma, la cual se disocia liberando el ssRNA (+). Durante la síntesis y producción de la partícula viral, las proteínas no estructurales inician la replicación del RNA dentro de invaginaciones en el retículo endoplásmico (RE) (Figura 4). Las invaginaciones crean una conexión tipo poro entre el citosol y el RE para el transporte de nucleótidos y cofactores de la replicación. Mientras la proteína E y prM son translocadas hacia el lumen del RE para su procesamiento, la partícula de ZIKV emerge del lumen del RE como un virión inmaduro compuesto por 60 unidades repetidas del heterotrímero prM/E. A medida que el virus transita por la vía secretoria, el ambiente ácido del Golgi desencadena la exposición de prM a la proteasa furina que escinde el precursor prM, dando lugar al virión maduro. La interacción entre prM y la proteína E naciente permite el correcto plegamiento y previene la trimerización prematura de E (Zhang *et al.*, 2013; Prasad *et al.*, 2017).

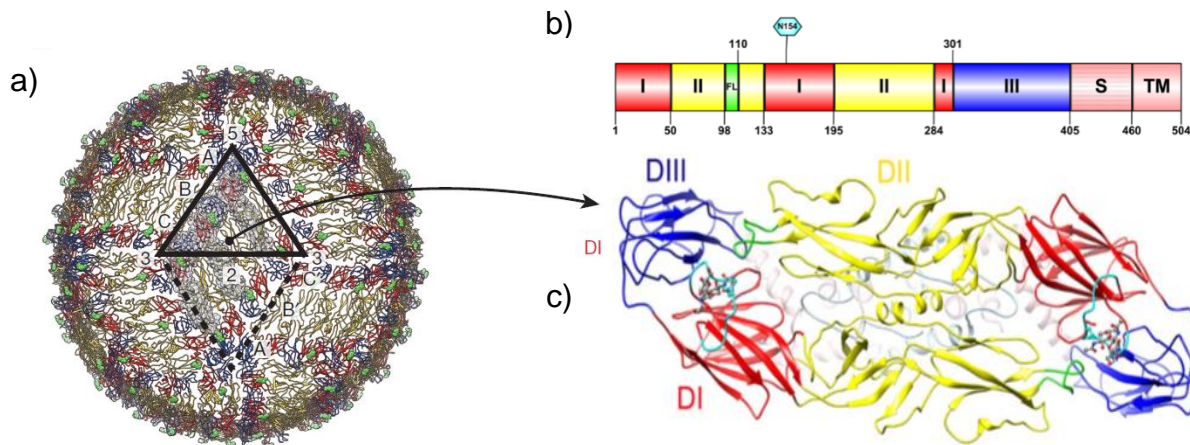


**Figura 4.** Ciclo del virus Zika. Los siete pasos principales del ciclo de vida son: A) Unión y entrada, B) Fusión y desensamblaje en el endosoma C) Traducción D) Replicación del

RNA E) Ensamblaje F) Maduración, G) Liberación (Tomada de Kuhn 2019. <https://www.bio.purdue.edu/lab/kuhn/research.html>)

### 3.4.1 PROTEÍNA E

La proteína E, de 504 aminoácidos, es la principal proteína involucrada en la unión al receptor y fusión con la célula huésped. La proteína E y M están organizadas con una simetría icosaédrica consistiendo de 60 unidades repetitivas, cada unidad asimétrica contiene tres proteínas E individuales (molécula A, B y C, figura 5a). La proteína E está arreglada de forma dimérica con tres dímeros paralelos entre sí, formando una balsa (figura 5b). En conjunto, 30 balsas cubren la superficie del virus.



**Figura 5.** Cryomicroscopía electrónica de la estructura del virus ZIKV y estructura de la proteína E. a) Partícula de ZIKV icosaédrica con los C- $\alpha$  principales de la proteína E. Los sitios de glicosilación de la Asn 154 se muestran en puntos color verde. Las tres proteínas individuales de ZIKV forman una unidad asimétrica (triángulo negro), indicada con superficie transparente (Kostyuchenko *et al.*, 2016). b) Organización de los dominios en la proteína E. c) Dímero de proteína E. Vista hacia abajo. DI (rojo), DII (amarillo), DIII (amarillo). Subyace el dominio transmembranal (rosa claro), *loop* de fusión (verde), glicano de la Asn 154 (representación de bola y palo) (cian: residuos 154 a 160) (Sirohi *et al.*, 2016).

La proteína E tiene cuatro dominios: un dominio transmembranal (TM) y tres ectodominios, DI, DII y DIII, que constituyen la superficie de la proteína (Figura 5b). El dominio DI forma una estructura  $\beta$ -barril que actúa como puente entre DII y DIII, y consta de un sitio de N-glicosilación en algunas cepas. El dominio DII tiene una estructura “finger-like” necesaria

para la formación dimérica de la proteína E y además es responsable de la fusión entre las partículas virales con la membrana endosomal de la célula, ya que contiene un *loop* de fusión (FL) altamente conservado. El epítipo FL es altamente inmunogénico e induce la producción de anticuerpos poco neutralizantes. El dominio DIII, con estructura “immunoglobulin like”, está involucrado en la unión al receptor durante la entrada del virus a la célula huésped. Contiene múltiples epítopos para las células T y B que median la inmunidad (Vogt *et al.*, 2011; Kostyuchenko *et al.*, 2016; Sirohi *et al.*, 2016). La proteína E es el blanco primario de anticuerpos neutralizantes (Sappararu *et al.*, 2016), por lo que es el antígeno de elección en la mayoría de las plataformas de vacunas contra el ZIKV

La proteína E tiene un único sitio de glicosilación en la Asn 154, al lado del *loop* de fusión. Esta proteína muestra alta similitud con las proteínas E de otros flavivirus, excepto en 10 aminoácidos que rodean el sitio de glicosilación, lo que podría contribuir al tropismo y a la enfermedad (Sirohi *et al.*, 2016).

### **3.4.2 PREVENCIÓN Y CONTROL**

Hasta el momento no existe tratamiento contra la infección del virus Zika. Normalmente se usan analgésicos para calmar el dolor; sin embargo, la aspirina y otros antiinflamatorios no esteroideos deben ser evitados hasta que se excluya la infección por dengue o Chikungunya, debido a que en estas infecciones están contraindicados (Fellner *et al.*, 2016). La estrategia principal para su combate se ha enfocado en la prevención del piquete por mosquito *Aedes aegypti* con especial atención para mujeres embarazadas y en etapa reproductiva. Las medidas de prevención incluyen principalmente protección individual y eliminación de los sitios de reproducción del mosquito como recipientes con almacenamiento de agua. Para personas viajeras que hayan estado en zonas endémicas de ZIKV, se recomienda el uso de condones de látex para evitar su transmisión sexual. De esta forma, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha decretado diversas acciones para promover el diagnóstico adecuado, seguir una vigilancia epidemiológica, controles vectoriales eficientes y sobre todo apoyar la investigación en el desarrollo de una vacuna contra el ZIKV (OMS 2017).

### 3.5 DESARROLLO DE VACUNAS CONTRA ZIKV

Debido a los daños que puede causar ZIKV, el desarrollo rápido y eficaz de una vacuna es la prioridad sanitaria. Dichas vacunas deberían prevenir la adquisición de la infección y proteger contra las secuelas severas causadas por ZIKV. Estos problemas son abordados por múltiples plataformas de vacunas como DNA, mRNA, ZIKV inactivo, ZIKV atenuados, vectores virales, proteínas, péptidos y partículas pseudovirales (PPV). No obstante, cada plataforma presenta ventajas y desventajas que pueden no ser adecuados para toda la población. Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta aproximadamente 38 candidatos a vacunas, 32 están en evaluación preclínica temprana, 5 han progresado a los ensayos de fase I y un candidato para vacuna está siendo evaluado en la fase clínica II, como se puede observar en la figura 6.

El enfoque clásico en el desarrollo de vacunas se basa en virus atenuados que inducen una respuesta humoral y celular fuerte y con bajo costo, en comparación con otras plataformas. Este acercamiento requiere la amplificación de virus infeccioso, y puede tener efectos adversos en pacientes inmunocomprometidos, como ancianos, recién nacidos y mujeres embarazadas (Fernández *et al.*, 2017). Actualmente, la proteína E de ZIKV es blanco para su uso como vacuna. Sin embargo, es muy poco inmunogénica y requiere de adyuvantes. Por otro lado, se ha propuesto el uso de vacunas de DNA prM/E ZIKV (Larocca *et al.*, 2016; Tebas *et al.*, 2017), las que son capaces de desencadenar una respuesta inmune humoral. No obstante, se dificulta la administración y existe riesgo de integración del material genético en el genoma del huésped, lo que se ha solucionado con el uso de vacunas de mRNA prM/E ZIKV (Richner *et al.*, 2017), que se traducen directamente en el citoplasma. Sin embargo, siguen teniendo dificultad en su administración y por consiguiente un nivel relativamente bajo de inmunogenicidad. Debido a esto, un candidato a vacuna contra el ZIKV son las partículas pseudovirales (PPV).

Vacunas candidatas contra ZIKV reportadas por la Organización mundial de la Salud					
Vector viral	Total	Fase pre-clínica	Fase clínica I	Fase clínica II	Empresas
Vector viral	10	9	1		Themis bioscience, NIAID
Virus inactivo	8	7	1		NIAID, Bharat Biotech, Takeda
PPV	5	5			Institutos de Investigación
Virus atenuado	4	4			NIAID
DNA	4	2	1	1	NIAID, Inovio Pharmaceuticals
Proteína	3	3			Institutos de investigación
mRNA	2	1	1		Moderna Therapeutics
Péptido	2	1	1		NIH
Total	38	32	5		
Proporción	-	84%	13%	3%	

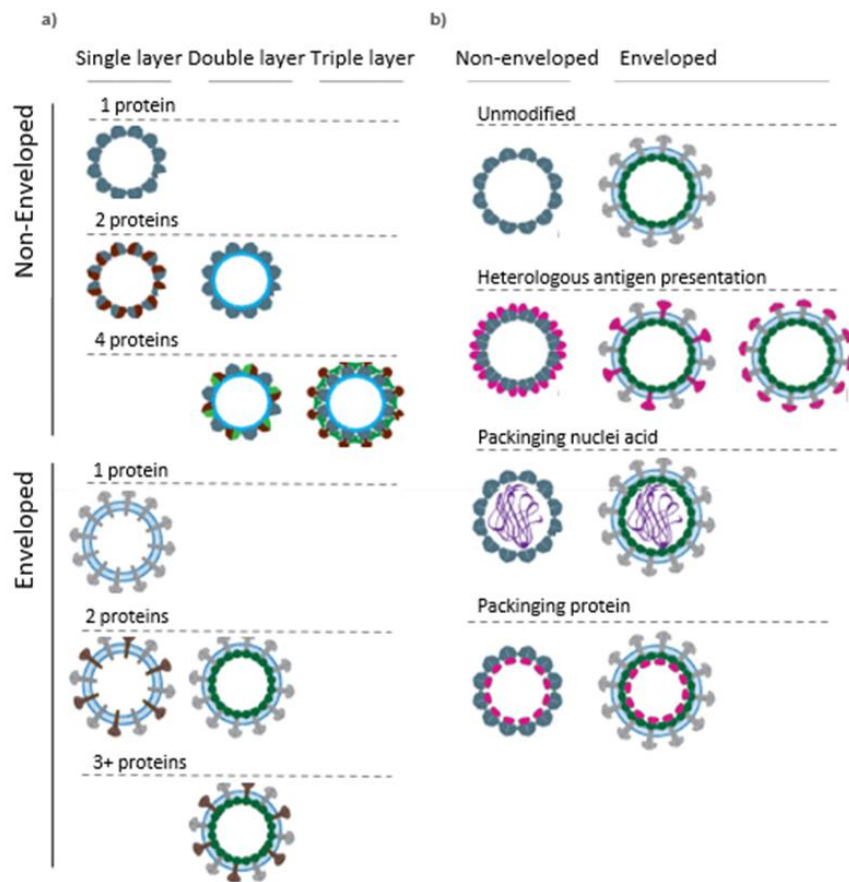
**Figura 6.** Vacunas candidas contra ZIKV. Las vacunas reportadas por la Organización Mundial de la Salud se encuentran en diversas etapas de desarrollo. NIAID (National Institutes of Allergy and Infectious Diseases). Modificado de Rangel *et al.*, 2017 y [www.who.int/immunization/research/vaccine\\_pipeline\\_tracker\\_spreadsheet/en/](http://www.who.int/immunization/research/vaccine_pipeline_tracker_spreadsheet/en/)

### 3.5.1 PARTICULAS PSEUDOVIRALES

En las PPV, los antígenos de superficie de virus se expresan de manera recombinante y se autoensamblan en una conformación ordenada como una partícula carente de material genético. Presentan características clave que resultan en alta inmunogenicidad y seguridad, como: a) Naturaleza particular y multivalente, b) Tamaño de 20 a 100 nm de diámetro, induciendo su reconocimiento y captación por las células presentadoras de antígeno, c) Geometría definida y estructuras ordenadas repetidas, que les confiere la capacidad de activar células B e inducir una respuesta de anticuerpos a largo plazo, d) Preservación de la conformación antigénica nativa) y e) Bioseguridad, debido a que no son infecciosas ni replicativas y por ende se anula la posibilidad de reversión que poseen las vacunas atenuadas y se elimina la manipulación del virus activo durante la producción (Jeohn *et al.*, 2017; Crisci *et al.*, 2013). Actualmente se encuentran en el mercado vacunas de PPV contra diferentes virus humanos como virus hepatitis B (Engerix-B® por GlaxoSmithKline, Recombivac HB ® por Merck, y GenHevacB® por Sanofi-Pasteur), contra el virus del papiloma humano (Cervarix® por GlaxoSmithKline, Gardasil® por Merck) y virus hepatitis E (Hecolin® por Xiamen Inovax Biotech).

### 3.5.1.1 Clasificación

Las PPV se pueden clasificar según su estructura y funcionalidad. En cuanto a su estructura, las PPV se pueden catalogar en partículas envueltas y partículas no envueltas (desnudas). Las PPV no envueltas a su vez pueden ser divididas en partículas de una capa, dos capas o tres capas según el número de proteínas que las conformen, lo mismo sucede para PPV envueltas, pero en este caso las proteínas se encuentran embebidas en una membrana lipídica (Figura 7) (Charlton H. *et al.*, 2018).

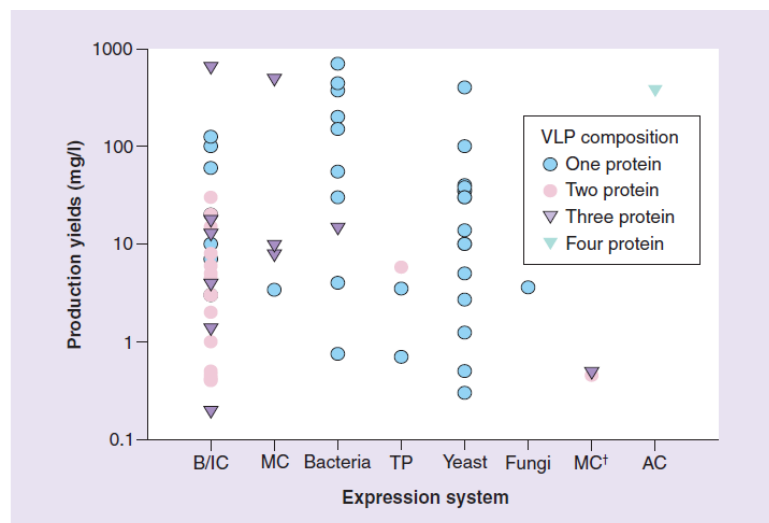


**Figura 7.** Clasificación de PPV. a) PPV clasificadas por su estructura. b) PPV clasificadas por funcionalidad. Modificada de Lua *et al.*, 2014.

En cuanto a su funcionalidad, las PPV se pueden clasificar en no modificadas, conformadas por las proteínas parentales del virus, y en quiméricas, compuestas por proteínas de virus distintos o por proteínas de fusión, llevando de esta forma antígenos heterólogos. A su vez, pueden ser utilizadas para encapsular ácidos nucleicos, moléculas o proteínas con la finalidad entrega. (Yan *et al.*, 2015; Fuenmayor *et al.*, 2017).

### 3.5.1.2 Sistemas de expresión utilizados para la producción de partículas pseudovirales

Un punto importante en la expresión de PPV es el sistema de expresión a utilizar el cual depende en gran medida de las características estructurales de PPV que se requieran. No todos los sistemas logran expresar correctamente todos los tipos de PPV. En segundo lugar, los niveles de productividad (Figura 8) requeridos también serán tomados en cuenta, aunque esto depende en gran parte del tipo de PPV a producir. Por último, el tipo de modificaciones postraduccionales, requeridas en la PPV, como la glicosilación.



**Figura 8.** Productividades logradas de PPV estructuralmente distintas utilizando diversos sistemas de expresión. B/IC: sistema baculovirus/células de insecto. MC: células de mamífero. TP: plantas transgénicas. MC+: baculovirus/células de mamífero. AC: células de ave (Modificado de Roldão *et al.*, 2010).

Diferentes tipos celulares difieren en el tipo y nivel de modificaciones pos-traduccionales, por ejemplo, la glicosilación. Los insectos sintetizan glicanos con manosa terminal y los mamíferos glicanos complejos (Schachter *et al.* 2009). Dado que el ZIKV tiene dos huéspedes insecto-mamífero, sería interesante evaluar si la glicosilación diferencial de las PPV - ZIKV impacta en la inmunogenicidad, lo que podría afectar directamente la eficacia de PPV como vacuna. Para ello es necesario en primera instancia producir PPV ZIKV en ambos sistemas.



### **3.5.1.2.1 Sistema de insecto baculovirus**

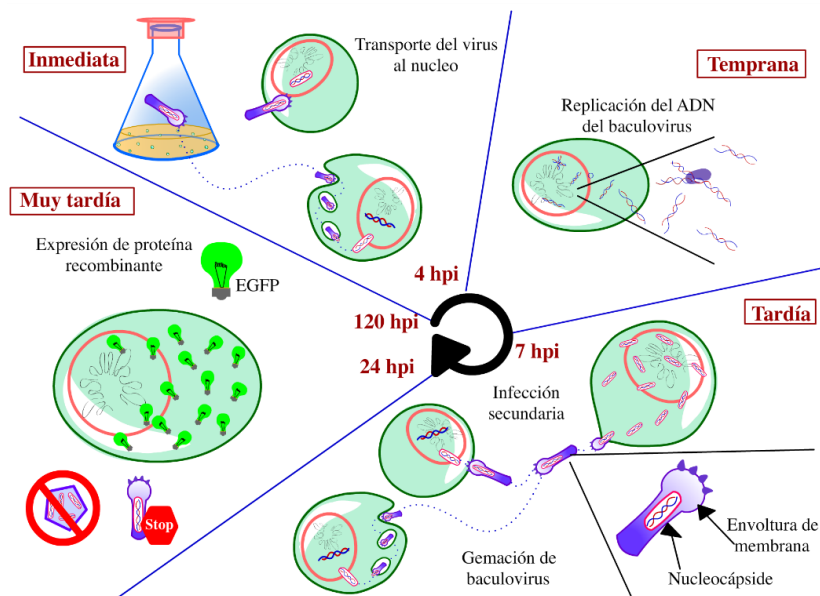
Hay varias vacunas de PPV producidas en el sistema de insecto baculovirus que se encuentran en desarrollo preclínico (por ejemplo, PPV de Ébola, PPV de Marbug, PPV del virus de Newcastle (NDV), PPV de norovirus, PPV del virus nudaurelia capensis omega y PPV del virus de la fiebre de Rift Valley (RVFV) (Roldão *et al.*, 2010). Hasta el momento, existen dos vacunas comerciales generadas por este sistema: la vacuna Cervarix®, vacuna contra el virus del papiloma humano (HPV) y Flublok®, vacuna contra el virus de la influenza. El 30% de las vacunas recombinantes se expresan en el sistema de insecto baculovirus.

Algunas de las características que hacen atractivo este sistema para la producción de PPV son: a) Producción de PPV más complejas, compuestas hasta por cinco proteínas de alto peso molecular: para ello, múltiples genes pueden ser clonados en un baculovirus para ser expresadas simultáneamente y formar el ensamblado multimérico o bien se puede realizar la coinfección con varios baculovirus que contengan diferentes genes b) Diseño de baculovirus simple y rápido, proporcionando una alta versatilidad. Esto es muy importante cuando se producen vacunas para virus cuya superficie de proteínas muta rápidamente (por ejemplo, el virus de la influenza), un requerimiento fundamental para enfrentar pandemias c) Modificaciones postraduccionales, de tal forma que las proteínas expresadas pueden conservar su funcionalidad biológica d) Alto rendimiento de PPV, desde 0.2mg/mL hasta cientos de miligramos por litro. Estos niveles de expresión se explican por la habilidad del virus para apagar la transcripción de genes del huésped y asignar el aparato transcripcional y traduccional a la expresión de genes heterólogos e) Crecimiento en suspensión, en medios libres de suero lo que facilita el proceso de escalamiento y de purificación (Palomares *et al.*, 2006; Roldão *et al.*, 2010; Rohrmann 2019).

#### **3.5.1.2.1.1 Componentes del sistema de célula de insecto-baculovirus (SCI-BV)**

El SCI-BV es un sistema transitorio de expresión de proteínas recombinantes que consiste en utilizar un baculovirus recombinante, vector de expresión (BEV), que infecte células de insecto y utilice la maquinaria para replicarse y expresar el transgén. El

baculovirus más utilizado como BEV es el núcleo poliedrovirus múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV), con genoma de DNA que infecta a insectos lepidópteros. El ciclo de vida del baculovirus involucra dos tipos de partículas virales: virión ocluido (OV) y virión gemado (BV). El OV está cubierto por una matriz cristalina compuesta por la proteína poliedrina, que forman cuerpos de oclusión. La función de los cuerpos de oclusión es proteger a los viriones del medio ambiente. Los OV no son infecciosos. El segundo tipo de partícula, el virión gemado, está envuelto por una membrana que adquiere al brotar de la célula en la fase tardía de su ciclo celular (Figura 9). Sólo los BV son infecciosos en cultivo celular (Palomares *et al.*, 2006; Palomares *et al.*, 2015; Rohrmann 2019).



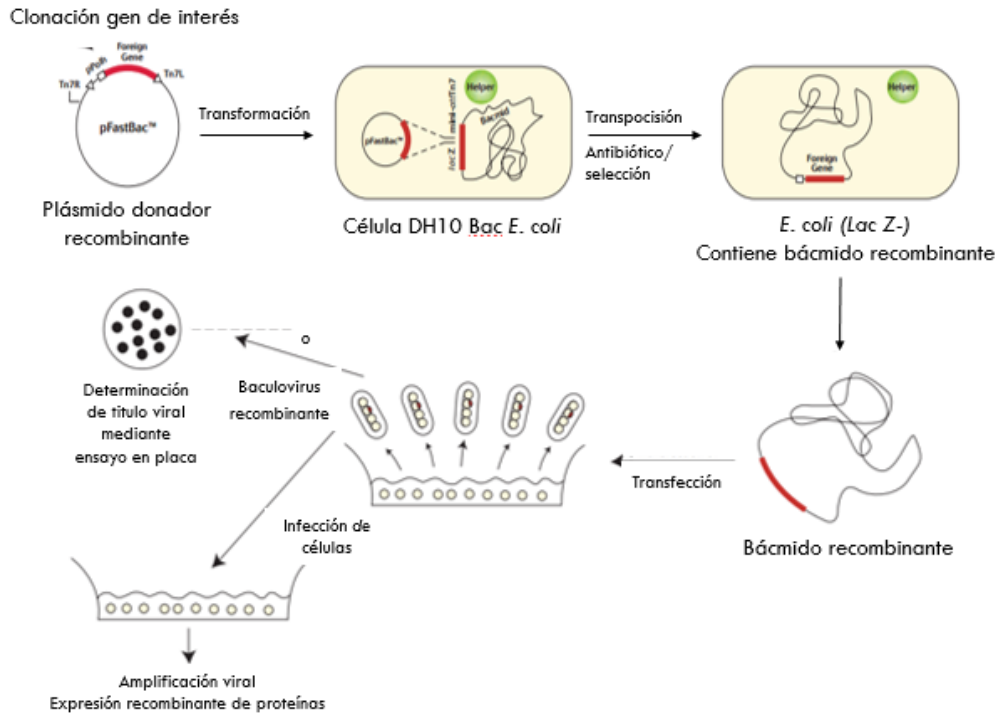
**Figura 9.** Ciclo de vida del baculovirus. Fase inmediata: Una vez que los baculovirus se encuentran en el intestino del insecto, la poliedrina es solubilizada por el bajo pH y los OV son liberados. Después los OV infectan a las células epiteliales y migran al núcleo. Fase temprana: se inicia la replicación de DNA, transcripción y traducción de los genes virales. En la fase tardía ocurre el ensamblaje de la nucleocápside y la liberación de los viriones (BV), que adquieren su membrana de la célula hospedera. Los viriones generan una infección secundaria al infectar nuevas células hospederas. En la fase muy tardía se inicia la transcripción de genes de *p10* y *phol* (poliedrina). Cesa la liberación de virus gemados e inicia la acumulación de viriones en el núcleo donde se convierten en viriones ocluidos (VO) en la matriz de poliedrina. Por último, los VO son liberados por las larvas al ambiente donde pueden ser ingeridos por otros insectos (Palomares *et al.*, 2006; Palomares *et al.*, 2015). Imagen realizada por el Lic. Enrique Paz.

Cuando los baculovirus son expandidos *in vitro*, la protección con poliedrina no es necesaria; además los viriones ocluidos no son infecciosos, por lo que se reemplaza el gen *polh* por el gen de interés. Esta es la base del SCI-BV, en donde se aprovecha el uso del promotor fuerte de *polh*. Hay otros promotores en el genoma de baculovirus como p10 y GP64 que también son utilizados para la expresión de proteínas recombinantes. Actualmente, existen células de insecto bien establecidas aisladas de tejidos indiferenciados de insecto utilizadas en el SCI-BV. Las líneas utilizadas son *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*. Las líneas Sf21 y Sf9 fueron aisladas de las células de ovario de pupa de *Spodoptera frugiperda* mientras la línea *Trichoplusia ni*, comercialmente conocida como High five® fue aislada de los oocitos de *Trichoplusia ni*, la cual produce más proteína recombinante que las células Sf9 (Palomares *et al.*, 2015).

#### **3.5.1.2.1.2 Producción de proteínas en el SCI-BV**

La generación de un baculovirus recombinante se hace de acuerdo al sistema de expresión Bac-to Bac® de Invitrogen. A continuación, se describe de forma general los pasos para la producción de proteínas en el SCI-BV (Figura 10) que se serán detallados en la sección de metodología:

- 1) Construcción del vector de transferencia.
- 2) Generación de báculo recombinantes mediante proceso de transposición en bacterias.
- 3) Generación de baculovirus recombinante al transfectar las células de insecto.
- 4) Selección de un baculovirus recombinante altamente productor.
- 5) Generación y titulación de stocks virales.
- 6) Producción de proteínas al infectar las células de insecto con el baculovirus recombinante seleccionado (Manual Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System. Invitrogen 2015).



**Figura 10.** Producción de proteínas recombinantes en el SCI-BV utilizando el sistema de expresión Bac-to-Bac®. Modificado del manual Bac to Bac. Invitrogen 2015.

### 3.5.1.2.2 Células de mamífero

Actualmente la producción de proteínas en células de mamíferos ha tenido un profundo impacto en investigación básica y aplicada; además han proporcionado una gran cantidad de medicamentos de gran éxito. La FDA (United States Food and Drugs Administration) ha aprobado 100 bio-terapéuticos derivados de esta plataforma, lo que ha dado lugar a industrias biofarmacéuticas con ganancias globales de US\$120 billones por año (Bandaranayake *et al.*, 2014).

La principal ventaja de las células de mamífero es la producción precisa y compleja de modificaciones postraduccionales. Dentro de ella se encuentra el patrón de glicosilación de las proteínas, relevante para glicoproteínas virales. Por esta razón, las células de mamífero son ampliamente utilizadas para la formación de PPV envueltas compuestas de múltiples proteínas estructurales. Estas son las características fundamentalmente que definen la selección de células de mamífero sobre otros sistemas a pesar del costo elevado, complejidad en la construcción y aplicaciones prácticas (Wurm *et al.*, 2004; Roldão *et al.*, 2010).

Hoy en día existen en el mercado tres vacunas de PPV con múltiples proteínas producidas en células de mamífero: GenHevacB® contra la hepatitis B, Epaxal® contra el virus de la hepatitis A Sci-B-Vac® contra el virus de hepatitis B que confieren mayor inmunogenicidad en comparación con las vacunas convencionales derivadas de levadura (Roldão *et al.*, 2010). Dadas estas mejoras, la investigación en la producción de PPV en células de mamífero contra diversos agentes patógenos ha incrementado.

#### **3.5.1.2.2.1 Líneas celulares para producir PPV**

Hay varias líneas celulares disponibles para la producción de PPV entre las que destacan las células CHO (células de ovario de hámster chino) y HEK-293 (células embrionarias de riñón de humano). Las células HEK-293 son una línea humana transformada con fragmentos de DNA de adenovirus; hay muchas variantes de esta línea. Las células 293N3S se desarrollaron para el crecimiento en suspensión y producción de adenovirus y la 293S fueron adaptada para crecer en condiciones sin suero. Posteriormente, con la finalidad de mejorar la expresión transitoria del gen, se desarrollaron dos líneas, la línea HEK-293T, que expresa el antígeno SV40 T y la 293-E, que expresa la proteína EBNA1 del virus de Epstein Barr. Las últimas dos líneas permiten la replicación episomal de plásmidos que contienen el origen de replicación de SV40 o EBV, respectivamente, prolongando la expresión de los transgenes al realizar transfección transitoria. La línea HEK-293T/17, derivada de la línea HEK-293, es capaz de obtener altos títulos de retrovirus. (Hess *et al.*, 2012).

Mientras que las células CHO han sido la principal fuente de producción de proteínas recombinantes, la línea 293 ha crecido en importancia con la constatación de que las proteínas producidas en las células HEK son más parecidas a las proteínas humanas en cuanto sus modificaciones postraduccionales y función. Debido a esto, se han producido varias PPV de diferentes tipos de virus en la línea HEK-293, entre ellos se encuentran: rabia, HIV, influenza, Ébola, dengue, Chikungunya, entre otros (Fontana *et al.*, 2015; Cervera *et al.*, 2013; Thompson *et al.*, 2013; Yamayoshi *et al.*, 2007; Boigard *et al.*, 2018; Akahata *et al.*, 2010).

### **3.5.1.2.2 Transferencia del material genético**

Los métodos que utilizan la transfección seguida de la selección con antibiótico han sido el proceso tradicional para la integración y selección de clonas. Si bien ha tenido éxito, es un proceso lento (7 meses), por lo que se han desarrollado métodos para mejorar la eficacia de entrega del material genético y reducir el tiempo para obtener una línea productora (Fontana *et al.*, 2015).

#### **a) Transfección transitoria**

Es un proceso mucho más rápido donde no se requiere la selección clonal. Las células son crecidas hasta la escala de producción deseada, pudiendo ser miles de litros y en ésta se realiza la transfección. Una desventaja es la cantidad de DNA (miligramos) requerida, así como la calidad en caso de que las PPV sean para uso clínico ya que es necesario eliminar o reducir al mínimo las endotoxinas bacterianas. (Roscov *et al.*, 2008). El agente comúnmente utilizado para transfección es el polímero polietilamina (PEI) de 25 kDa, debido a su relación eficiencia/costo. Este sistema se utiliza para la producción de varias proteínas como PPV, vectores virales y anticuerpos. Se ha llegado a obtener hasta 250 mg de anticuerpo al transfectar a células CHO a una densidad de  $4 \times 10^6$  cel/mL, sin embargo, la cantidad se duplica al utilizar las HEK-293 (Bandaranayake *et al.*, 2013).

#### **b) Vectores virales**

Los vectores lentivirales (LVs) son replicones defectuosos utilizados para entregar genes a células mediante transducción, por lo que normalmente son utilizados en terapia génica. Los LVs son un sistema atractivo debido a que transducen eficientemente células en división y sin división; se integran en áreas abiertas de la cromatina donde la transcripción es activa, son más seguros que otro sistema viral y recientemente se han utilizado para generar de forma rápida líneas celulares de mamíferos altamente productivas (Prieto *et al.*, 2011). Además, los LVs se han usado para la producción de PPV de JEV y de rabia (De Wispelaere *et al.*, 2015; Fontana *et al.*, 2015).

### 3.5.1.2.3 Vectores lentivirales

#### a) Componentes básicos de lentivirus

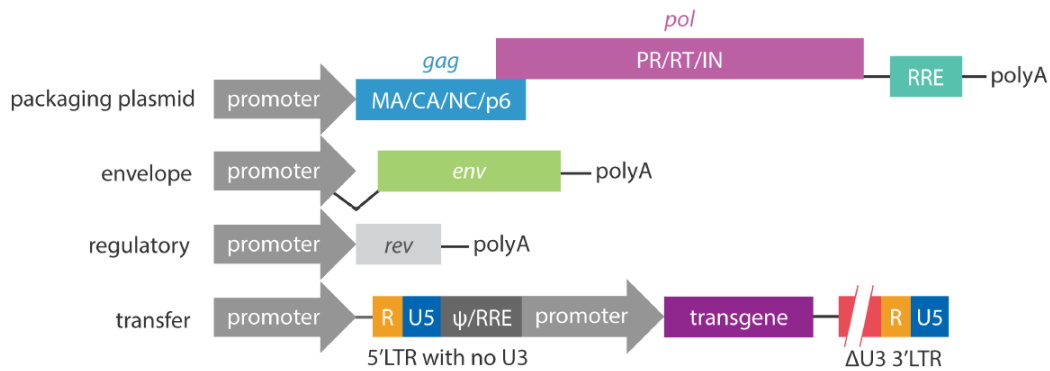
El sistema lentiviral más utilizado se basa en el genoma del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (HIV-1), perteneciente a la familia *Retroviridae*. Los miembros de esta familia contienen un genoma de RNA de cadena sencilla con polaridad positiva que es convertido a DNA por la transcriptasa reversa e integrado el genoma de la célula.

Los LVs contiene tres genes principales: *gag*, *pol* y *env*. El gen *gag* codifica para las proteínas que componen la matriz (MA), la cápside (CA) y nucleocápside (NC), necesarias para el ensamblaje e infección. El gen *pol* codifica las enzimas esenciales para su replicación: proteasa viral (PRO), transcriptasa reversa (RT) e integrasa (IN), cruciales para la transcripción reversa e integración en el genoma. El gen *env* codifica para la proteína de superficie que determina el tropismo y la entrada del virus a la célula. Además de estos tres genes el genoma viral contiene genes regulatorios (*tat* y *rev*) que activan la transcripción viral, así como genes accesorios (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*), esenciales para la replicación viral en el huésped (Klimatcheva *et al.*, 1999).

#### b) Vectores lentivirales recombinantes

Como se mencionó anteriormente, este es un sistema atractivo para terapia génica o bien para la generación de líneas estables altamente productoras de proteínas recombinantes. Sin embargo, durante el proceso de replicación defectuoso existe la posibilidad de generar accidentalmente lentivirus con replicación competente por recombinación homóloga con elementos virales endógenos. Por tal motivo, desde la primera generación hasta la tercera de LVs, se han eliminado genes esenciales y algunos regulatorios y se han reemplazado los LTR (secuencias largas terminales) por promotores heterólogos y señales de poliadenilación. Además, el genoma se ha dividido en diferentes plásmidos, buscando disminuir al máximo la probabilidad de recombinación y posible generación de un lentivirus (Delenda *et al.*, 2004).

Los vectores lentivirales de tercera generación consisten en un sistema de vectores compuesto por cuatro vectores: empaquetamiento, envoltura, regulatorio y de transferencia (Dull *et al.*, 1998; Delenda *et al.*, 2004) (Figura 11).



**Figura 11.** Representación esquemática de los vectores lentivirales de tercera generación. [https://www.abmgood.com/marketing/knowledge\\_base/The\\_Lentivirus\\_System.php#20](https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/The_Lentivirus_System.php#20)

1.- Vector de empaquetamiento (pMDL/pRRE): Poseen los genes codificantes para *gag* y *pol*.

2.- Vector de envoltura (pMD.G): Codifica para la proteína de envoltura del virus de estomatitis vesicular (VSV-G), la cual tiene un amplio tropismo y es mucho más estable que la proteína de envoltura de HIV-1 (Akkinä *et al.*, 1996).

3.- Vector regulatorio (p-Rev): Posee la secuencia que codifica para la proteína Rev, la cual se une a la secuencia RRE presente en el plásmido pMDL/pRRE y pLV y controla la exportación del núcleo al citoplasma.

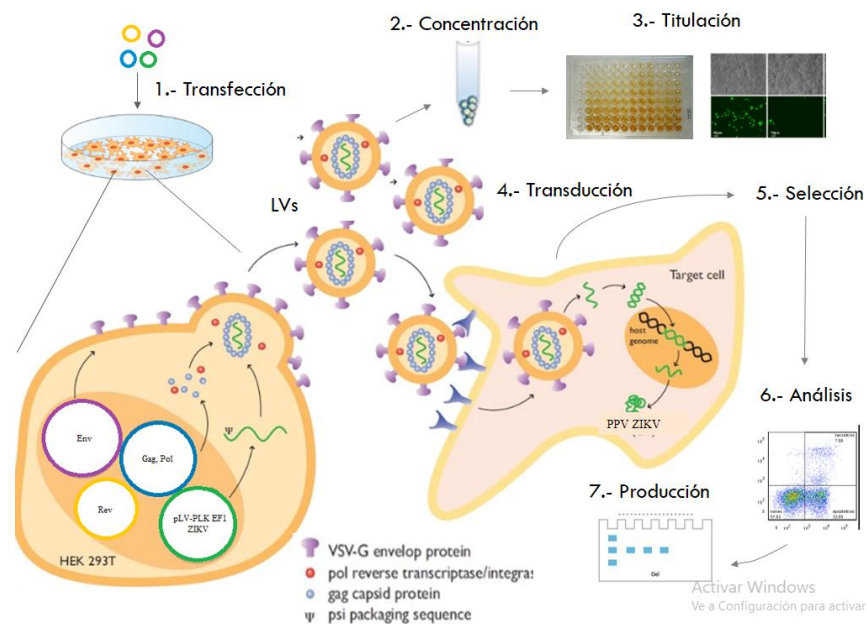
4.- Vector de transferencia (pLV) que contiene las siguientes secuencias:

- Psi: secuencia de empaquetamiento requerida para la incorporación del ARN del transgén a las partículas virales.
- RRE (*Rev response element*): secuencia de unión de la proteína Rev, la cual promueve la exportación del ARN mensajero del núcleo al citoplasma.
- WPRE (*woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element*): región estabilizadora del ARN mensajero.
- cPPT (*central polypurine tract*): región rica en purinas que facilita la translocación nuclear del complejo de pre-integración.
- Promotor: puede ser de CMV (Citomegalovirus) o HF1 $\alpha$  (de origen humano).
- LTR (Long terminal repeat): Normalmente tiene un LTR en cada extremo 5' y 3' compuesto por las regiones U3-R-U5 y U5-R-U3 respectivamente. las cuales están



implicadas en transcripción, transcripción reversa e integración. La región U3 del 5' ha sido remplazada por el promotor fuerte del RSV (virus del sarcoma de Rous) y la región U3 del 3' LTR ha sido eliminada dando lugar a un vector auto inactivante SIN (self inactivating vector).

Posteriormente, al realizar la transfección transitoria con los cuatro vectores mencionados se obtienen partículas lentivirales defectuosas en el sobrenadante de cultivo. Las partículas lentivirales son concentradas y tituladas. Luego se transducen las células, se seleccionan las células transducidas y se analizan aquellas productoras de proteína (Figura 12), este proceso será más detallado en la sección de metodología (Figura 12).

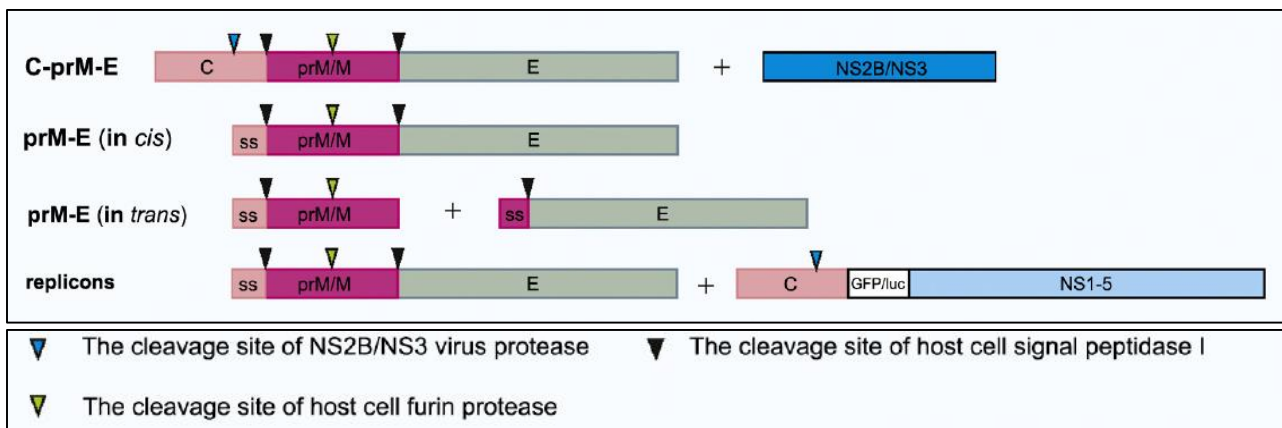


**Figura 12.** Producción de proteínas recombinantes mediante vectores lentivirales.

### 3.5.2 Estrategias de producción de PPV de flavivirus

Se han aplicado dos enfoques para la producción de PPV recombinantes de flavivirus. Una de ellas es la expresión de los genes de las proteínas prM-E/ M-E y la segunda corresponde a la coexpresión de genes que codifican las proteínas estructurales C-prM-

E en un solo cassette, junto con los genes que codifican la proteasa viral NS2B / NS3 (Figura 13). Se ha reportado que la proteína C no es necesaria para la formación de partículas, sin embargo, su inclusión puede tener un efecto estabilizador del ensamblaje de PPV. Otro punto que considerar es la forma de expresión de proteínas prM y E, que se puede realizar tanto en forma en *cis* como en *trans* (Krol *et al.*, 2019). Las PPV también se pueden obtener utilizando como estrategia un replicón, donde las proteínas no estructurales junto con las proteínas C están codificadas en un vector y los genes de prM y E en un segundo vector.



**Figura 13.** Estrategia general para la construcción de PPV de flavivirus: Expresión en un cassette de las proteínas estructurales (C-prM-E) coexpresadas con las proteasas NS2B/NS3 requeridas para el corte la proteína C. PPV también puede ser generadas por la coexpresión de las proteínas prM y E con la inclusión de su secuencia señal (ss) (cortada por una peptidasa señal del huésped) en conformación cis o trans. Tomada de Krol *et al.*, 2019.

Como se mencionó anteriormente, el sistema de expresión influye en la eficiencia del ensamblaje, pero también en la maduración de las PPV. La expresión de las proteasas requeridas para el ensamblaje es una cuestión clave para escoger el sistema. Por ejemplo, la furina producida por las células de insecto tiene baja eficiencia en el corte prM que da lugar a la proteína M madura. Esto puede evitarse mediante la expresión de células de mamífero para producir viriones maduros (Mukherjee *et al.*, 2016). Otro problema en la producción de PPV es el grado de reconocimiento de las secuencias señal de la proteína prM y E por las peptidasas señal.

Las PPV recombinantes de flavivirus se han producido eficientemente utilizando diferentes diseños (Tablas 2 y 3). Uno de ellos se basa en la coexpresión de las proteínas prM y E en ausencia de la proteína C del virus dengue 2 (DENV2) (Chang *et al.*, 2001). Otro diseño incluye la construcción de una químera que contiene las proteínas prM/E DENV2, en la cual se sustituye la región transmembranal de la proteína E de DENV por la de la proteína E del JEV (Chang *et al.*, 2003). La inserción del fragmento de JEV disminuye la retención en el retículo endoplásmico, lo que contribuye a una secreción eficiente de PPV de estas químeras de DENV2 (Hsieh *et al.*, 2008). Adicionalmente, se ha reportado que la secuencia señal de JEV favorece la secreción eficiente de las PPV de DENV1 y que la combinación de la secuencia JESS y el dominio transmembrana de JEV hace más eficiente la secreción de PPV de DENV2. Es posible que estrategias que han resultado exitosas para la producción de otros flavivirus sean eficientes para producir PPV de ZIKV.

**Tabla 2. PPV de flavivirus (DENV)**

Tipo de PPV	Sistema de expresión	Descripción	Tamaño (nm)	Referencia
<b>prM-E/M-E</b>	<i>P. pastoris</i>	prM-E	30	Liu et al., 2010
	HEK-293T	Secuencia señal e intercambio de TM de E por JEV		Heish et al., 2008
	COS-1	Se intercambió TM de E por el de JEV	40	Chang et al., 2003
	HEK-293T	C-prM-E cotransfectada con NS2B/NS3	50	Boigard et al., 2018
	<i>Sf9</i>	Dominio III de E fusionado a $\gamma$ RlgE y Pr55Gag	120	Chua et al., 2013
<b>Quiméricas</b>	<i>P. pastoris</i>	Primero 395 aminoácidos de E en HBsAg	20	Bisht et al., 2002
	<i>Sf9</i>	Aminoácidos de 352-368 y 386-397) del dominio III de E en B19 de parvovirus	30	Amexis et al., 2006

### 3.5.3 PPV de ZIKV

Actualmente existen tres reportes de la producción de PPV de ZIKV (Tabla 3). Yang *et al.* (2017) ideó PPV utilizando el antígeno del virus de la hepatitis B (HBcAg) como soporte del dominio III de la proteína E de ZIKV de forma estable en la planta *Nicotiana benthamiana*. Por otro lado, Boigard *et al.* (2018) formó PPV de ZIKV de aproximadamente 60 nm de diámetro al coexpresar de manera transitoria las proteínas estructurales (CprM) y no estructurales (NS2B/NS3) de ZIKV en el pellet de células HEK-293 cultivadas en suspensión. En cambio, Dai *et al.* (2018) expresaron la proteína prME en células de insecto mediante el sistema insecto-baculovirus de donde obtuvieron PPV ZIKV de aproximadamente 30 a 50 nm. Hasta el momento se han formado PPV de ZIKV en células de insecto y de mamífero con expresión transitoria. Es deseable obtener PPV en el sobrenadante de cultivo para ambos sistemas y de forma estable en las células de mamífero, lo que aumentaría la producción y facilitaría la purificación para su uso posterior.

Tabla 3. PPV recombinantes de ZIKV

PPV	Características de producción					Referencias
	Sistema de expresión		Línea celular	Proteínas	Tamaño nm	
	Huésped	Tipo				
<b>PrM/ M y E proteína</b>			Sf9	prM –E	30-50	Dai <i>et al.</i> 2018
	Insecto	Transitoria	HEK-293	prM-E	60	Boigard <i>et al.</i> 2018
	Mamífero	Transitoria	CAP	prM-E, C co-transfectada NS2B/NS3, NS1. Pellet		Salvo <i>et al.</i> , 2018
<b>Quiméricas</b>	Plantas	Estable	<i>Nicotiana benthamiana</i>	HBV mostrando el dominio III de la proteína E ZIKV. Extracción.	30	Yang <i>et al.</i> 2017

#### **4 JUSTIFICACIÓN**

Debido a los daños que puede causar ZIKV, el desarrollo rápido y eficaz de una vacuna es prioridad sanitaria. Una alternativa es el uso de PPV, debido a las propiedades antigénicas de la glicoproteína E del virus. Dado que el patrón de glicosilación de la proteína E varía dependiendo de su origen (mamífero o insecto, huéspedes del virus) es conveniente producir PPV en ambos sistemas. Posteriormente, resultará interesante evaluar si el patrón de N-glicosilación diferencial de la glicoproteína E impacta en la respuesta humoral, ya que hasta el momento no está definido.

#### **5 HIPÓTESIS**

La expresión de la químera ss, ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM) en células de insecto y la generación de una línea estable de células de mamífero resulta en la formación de PPV de Zika en el sobrenadante de ambos sistemas.

## **6 OBJETIVOS**

### **6.1 OBJETIVO GENERAL**

**6.1.1** Producir partículas pseudovirales de ZIKV en el sobrenadante de células de insecto y mamífero.

### **6.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

**6.2.1** Diseñar una químera para generar PPV de ZIKV en el sobrenadante de ambos sistemas.

**6.2.2** Caracterizar la producción de PPV de ZIKV en el sistema de insecto-baculovirus.

**6.2.3** Generar una línea estable de células de mamífero productoras de PPV de ZIKV.

**6.2.4** Caracterizar la producción de PPV de ZIKV en el sistema mamífero.

## 7 METODOLOGÍA

### 7.1 SÍNTESIS

#### 7.1.1 Secuencia ss-M-E (minus TM) ZIKV, (TM) JEV

Los nucleótidos 94 a 10365 del genoma de la cepa de ZIKV de origen asiático, BeH815744 (GenBank: KU365780.1), corresponden a la secuencia codificante (CDS) que da lugar a una poliproteína. Cugola *et al.*, (2016) reportan que los aminoácidos 216 al 794 de la CDS corresponden a la proteína M- E. Por otro lado, el genoma de la cepa del virus de encefalitis japonesa, SA14-142 (Gen Bank: KY683775.1) codifica para una poliproteína parcial que contiene a la proteína E. Ambos genomas se tradujeron a proteína con el programa Translate, Expasy. Posteriormente, con el algoritmo TMHMM se identificó la región transmembranal de la proteína E de ZIKV y JEV. Después, la región transmembranal (TM) de ZIKV fue eliminada y sustituida por la región TM de JEV. Además, en el 5' de la secuencia se añadió la secuencia Kozak seguida de una secuencia señal (ss) de pcBWN, mientras que en el extremo 3' se añadieron dos codones de paro. La secuencia ss-M-E (minus TM) ZIKV, (TM) JEV fue sintetizada por Genscript en el vector pcDNA 3.1 (+). El diseño se detalla en la sección de resultados.



**Figura 14.** Esquema de la secuencia ss, ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM).

#### 7.1.2 Oligonucleótidos

En el programa OligoT se diseñaron los oligos para secuenciar el promotor y el transgén (inserto) ss, ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM) a partir de cada extremo y de la parte interna del mismo. Así mismo, se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar el transgén con los sitios de restricción compatibles para ser clonados en el vector pFast-Bac, plásmido donador del sistema insecto baculovirus, y pLV PLK-HF1 $\alpha$ , plásmido de transferencia para el sistema lentiviral. Cada oligonucleótido incluye parte del transgén (negro), sitios de restricción (rojo) y bases aleatorias (azul) para el posicionamiento de la enzima (Tabla 4).

<b>Tabla 4.</b> Oligonucleótidos utilizados en este trabajo		
<b>Para secuenciar</b>		<b>Tm</b>
Fw- Inserto	5'-GGCTTATCGAAATTAATACGACTCACT3'	58.8
Rv-Inserto	5'-GGTTTAAACGGGCCCTCTAGA-3'	58.5
Fw-Inserto-Interno	5'-CAGCACAGTGGGATGATTGTT-3'	59.0
Rv-Inserto-Interno	5'-CCCAGCGTGCCAAGGTAA-3'	58.9
Fw-Promotor	5'-GCTGCTTCGCGATGTACGG-3'	60.7
Rv Promotor	5'-CGATAAGCCAGTAAGCAGTGGG-3'	60.0
<b>Para clonar en pFast Bac</b>		
Fw-Bam-Inserto	5'-GTACTAGGATCCACCATGGGCAAGAGGT-3'	54.6
Rv-NheI-Inserto	5'-TTTATGGCGGCCGCTTATCAAG-3'	54.9
Fw F13	5'- CCCATGTCACGACGTTGTAAAACG -3'	56.0
<b>Para clonar en pLV PLK EF-H1<math>\alpha</math></b>		
Fw-NheI-Inserto	5'-ATACTAGCTAGCACCATGGGCAAGA-3'	56.6
Rv-BamHI-Inserto	5'-CATAAAGGATCCTTATCAAGCATGCACATTGGTTCG-3'	56.1

### 7.1.3 Secuenciación

El DNA plasmídico fue secuenciado en un equipo automatizado marca Applied Biosystems modelo 3100 (Foster City CA, USA).

## 7.2 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### 7.2.1 Cepas y soluciones

**DH5 $\alpha$  E. coli:** Se utilizó para el aislamiento y amplificación de diferentes plásmidos.

**Medio LB:** Para 1 L, se disolvieron 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl en agua milliQ. Se esterilizó en autoclave.

**Medio LB-agar:** Para 1 L, los componentes de medio LB más 15 g de agarosa se aforó a 1L con agua milliQ. Se esterilizó en autoclave.

**Medio SOC:** Para 100 mL, se disolvieron 2 g de triptona, 0.5 g levadura, 0.0584 g de NaCl, 0.0186 g de KCl en agua milliQ, se ajustó el pH a 7. Se esterilizó en autoclave.

**Mg 2M:** Para 10 mL, se disolvieron 2.05 g MgCl<sub>2</sub>, 2.46 g MgSO<sub>4</sub>, en agua milliQ. Se esterilizó por filtración 0.22  $\mu$ m.



**Glucosa 2 M:** Para 10 mL, se disolvió 3.6 g glucosa en agua milliQ. Se esterilizó por filtración 0.22  $\mu\text{m}$ .

**Medio de recuperación:** Para 1 mL se utilizaron 980  $\mu\text{L}$  de medio SOC, 10  $\mu\text{L}$  de Mg 2 M y 10  $\mu\text{L}$  glucosa 2 M.

### 7.2.2 Amplificación por PCR

El transgén se amplificó utilizando los oligonucleótidos para clonar en el plásmido pFast Bac/ pLV PLK EF1  $\alpha$  de la tabla 4, los componentes de la tabla 5 y el protocolo descrito en la tabla 6. El producto de PCR se analizó en gel de agarosa al 1% para verificar el tamaño y posteriormente la reacción se purificó con el Kit DNA Clean-Concentrator™ (Zymo, Catálogo D4004) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Componentes	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Amortiguador HF 5x	10
Oligonucleótido Fw (10 mM)	2.5
Oligonucleótido Rv (10 mM)	2.5
dNTPs (10 mM)	1
Pol phusion	.5
DNA	2 ng
Agua	Para 50
Volumen final	50

Paso	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización	98°C	30 s	
Desnaturalización	98°C	10 s	30x
Alineamiento	*	30 s	
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	10 min	
Mantenimiento	12°C	$\infty$	
*pFast-Bac 59.0°C, pLV PLK HF1 $\alpha$ 56 °C			

### 7.2.3 Corte con enzimas de restricción

El transgén y el vector pFats-Bac/ pLV PLK EF1  $\alpha$  fueron digeridos con las enzimas BamHI y NheI y el vector pcDNA 3.1 (+) con NheI y NotI. La reacción se realizó por 2 h a 37°C empleándose 10 U por cada microgramo de DNA en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ . Los productos fueron corridos en gel de agarosa al 1%. En el caso de utilizar los productos cortados para ligación, se adicionó 1  $\mu\text{L}$  de enzima CIP a la reacción del vector para evitar su religación ya que defosforila los extremos 5' y 3'. La purificación del producto por corte con enzimas a partir de banda se realizó con el kit Gel Extraction DNA Monarch

(New England BioLabs, Catálogo T1020L) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### **7.2.4 Reacción de ligación**

La ligación del inserto y del vector se realizó en proporción 1:3 y 1:5 molar respectivamente, con 1  $\mu$ L de T4 ligasa, 2 $\mu$ L de amortiguador10x en 20  $\mu$ L de reacción a 16 °C durante la noche (OVN) o a 25°C por 2 h. La mezcla de reacción se utilizó para transformar *E. coli*.

#### **7.2.5 Transformación de células quimiocompetentes**

Se mezclaron 10 $\mu$ L de reacción de ligación o 500 ng de DNA plasmídico y 100  $\mu$ L de *E. coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes, se incubaron en hielo por 30 min y luego se sometieron a choque térmico por 1 min a 42°C; inmediatamente después se regresaron al hielo. Se resuspendieron en 250  $\mu$ L de medio de recuperación y se incubaron a 37°C por 1 h a 250 rpm. Transcurrido el tiempo, se sembraron 100  $\mu$ L en placas de agar LB ampicilina a 100  $\mu$ g/mL y se incubaron a 37°C OVN.

#### **7.2.6 Mini-preparación de DNA plasmídico**

Las colonias fueron cultivadas en 5 mL de LB con ampicilina a 100  $\mu$ g/mL durante 12 a 16 h a 37°, 250 rpm. Se extrajo el DNA plasmídico con el Kit Miniprep Zyppy™ (Zymo Research, Catálogo D4090) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, el DNA se eluyó con 50  $\mu$ L de agua miliQ grado biología molecular.

#### **7.2.7 Maxi preparación de DNA plasmídico**

A partir de una colonia y se inculó en 5 mL de LB con 100  $\mu$ g/ mL de antibiótico y se incubó durante 8 h a 37°C, 300 rpm. Se tomaron de 100 a 200  $\mu$ L del cultivo anterior y se diluyeron en 100 mL de medio LB con antibiótico. Se incubó por 14 h aproximadamente hasta alcanzar una densidad de 3 - 4 x10<sup>9</sup> cel/mL. El cultivo se centrifugó a 6000 x g por 15 min a 4°C, el sobrenadante se desechó. El pellet fue resuspendido con vortex en 4 mL de amortiguador de lisis. Posteriormente, se siguieron las especificaciones del proveedor del Kit Plasmid Midi Prep (QIAGEN, Catálogo 12263). El pellet de DNA fue re-suspendido en 100  $\mu$ L de agua estéril grado biología molecular.

## 7.3 PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS PSEUDOVIRALES

### 7.3.1 Líneas celulares

**Células Sf9** (ATCC® CRL-1711™), línea celular derivada del ovario de *Spodoptera frugiperda*.

**HEK-293** (ATCC® CRL-1573™), línea celular proveniente de las células de riñón de embrión humano transformadas con adenovirus (Graham F. *et al.*, 1977). Las células fueron donadas por la Dra. Rita Rescano Cassulini del Instituto de Biotecnología, UNAM.

**HEK-293T/17** (ATCC®, CRL-11268™), es el clon número 17 derivado de la línea celular HEK 293 que expresan constitutivamente al antígeno T del virus SV40. Las células fueron donadas por el Dr. Claudio Prieto de la Universidad Nacional de Litoral.

### 7.3.2 Medios de cultivo y suplementos

#### **Medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)**

El medio DMEM (13.5 g/L, Sigma D7777) y bicarbonato de sodio (3.7 g/L, Sigma) se disolvieron en agua milliQ, posteriormente se ajustó el pH a 7.3 con 400 µL de HCl concentrado. El medio fue esterilizado por filtración con una membrana de 0.22 µm de PVDF. Previo a su uso, se realizó un análisis microbiológico. El medio se almacenó a 4°C al resguardo de la luz.

#### **Tripsina**

Se disolvió tripsina (Sigma, T1426) 0.15 w/v y Na<sub>2</sub> EDTA (Merck) 0.02 w/v en PBS atemperado a 37°C, posteriormente fue esterilizada por filtración. Se utilizó en una relación de 25 µL por cada cm<sup>2</sup> durante tres min a 37°C.

#### **Suero fetal bovino (SFB)**

El SFB (BioProducts) fue descoplementando por incubación en baño María a 55°C por 30 min.

### 7.3.3 Criopreservación de las líneas y descongelación

Las líneas y clonas celulares se preservaron en nitrógeno líquido. Los bancos se realizaron cuando las células estaban a una confluencia mayor o igual al 90%. Después de realizar el conteo celular, las células fueron centrifugadas a 200 xg durante 10 min a TA en el rotor (F34-6-38). El sobrenadante se descartó y el pellet celular fue re-

suspendido en la mezcla compuesta por 10% DMSO (dimetil sulfóxido), medio DMEM con 10% SFB y 10% de medio metabolizado, de tal forma que quedara a una concentración de  $1-2 \times 10^6$  cel/mL. En crioviales se colocó 1 mL de la mezcla resuspendida y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 48 h; transcurrido este período, se colocaron en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Las células se descongelaron por el contacto rápido del criovial con las palmas de las manos. La suspensión celular descongelada se diluyó en 8 mL de medio DMEM suplementado con 10% SFB en una caja T25 con la finalidad de diluir el DMSO. Las células se incubaron y tras cinco h, el medio se sustituyó por medio nuevo DMEM con 10% SFB. Esto se realizó con la finalidad de propiciar la adherencia de las células y eliminar el DMSO, tóxico para ellas.

### **7.3.4 Sistema de insecto baculovirus**

#### **7.3.4.1 Generación del báculo recombinante**

La cepa bacteriana, DH10 Bac<sup>TM</sup>, contiene parte del genoma de baculovirus en un vector shuttle (báculo) y un plásmido auxiliar (helper) que codifica para la tranposasa encargada del proceso de transposición entre el plásmido donador que contiene el gen de interés y el vector shuttle dando lugar a un báculo recombinante. El gen de interés se inserta en la región de un gen reportero, generalmente LacZ. Las células DH10 Bac que contengan el gen de interés se seleccionan por no poder hidrolizar el sustrato X-gal dando lugar a colonias blancas.

Para ello se adicionaron 500 ng del plásmido pFast-Bac a 100  $\mu\text{L}$  de *E. coli* DH10 Bac quimiocompetentes. La transformación de células quimiocompetentes se hizo por incubación a  $37^{\circ}\text{C}$ , 250 rpm por 4h. Transcurrido el tiempo, se sembraron 100  $\mu\text{L}$  de las células en cajas de cultivo LB-agar con 14 $\mu\text{g}/\text{mL}$  gentamicina, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  tetraciclina, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  kanamicina, 50 mg/mL IPTG y 40 mg/mL Xgal. Las placas se incubaron a 48 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Las colonias blancas fueron resembradas en placas LB-agar con X-gal, IPTG y los antibióticos de selección para confirma su fenotipo.

### 7.3.4.2 Análisis de bácmidos recombinantes por PCR

Se hizo PCR de las colonias blancas resemebradas con los oligonucleótidos Fw-Bam-Ins y Rv-NheI-Ins para verificar la presencia del transgén utilizando los componentes de la tabla 7 de la columna de colonia y el protocolo de la tabla 8. El producto de PCR se analizó en gel de agarosa al 1% para verificar el tamaño. Las colonias con el transgén se inocularon en 5 mL de medio LB con los antibióticos de selección y se incubaron a 37°C, 250 rpm por 16 h. Posteriormente, los bácmidos se purificaron con el kit QIAGEN siguiendo las especificaciones del proveedor. El bácmido recombinante se cuantificó y la presencia del transgén se analizó por PCR con los oligonucleótidos anti-sentido Fw-Bam-Ins y Rv-NheI-Ins así como M13 Fw y Rv-NheI-Ins usando los componentes de la columna de bácmido de la tabla 7 con el mismo protocolo; de igual forma, el producto de PCR se analizó por gel de agarosa al 1%. Los oligonucleótidos M13 hibridan en las regiones que flanquean los sitios de transposición mini attN7 del bácmido recombinante.

Tabla 7. Componentes de PCR		
	Colonia	Bácmido
Componentes	μL	μL
Amortiguador Taq 10X	2.5	2.5
Oligonucleótidos Fw (10mM)	0.5	0.5
Oligonucleótidos Rv (10Mm)	0.5	0.5
dNTPs (10 mM)	0.5	0.5
Pol tag	0.125	0.125
DNA	NA	5 ng
Agua	20.87	-
Volumen final	25	25

Tabla 8. Protocolo		
Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	95°C	3 min
Desnaturalización	95°C	45 s
Alineamiento	55°C	30 s
Extensión	68 °C	4 min
Extensión final	72°C	10 min
Mantenimiento	12°C	∞

NA. No aplica

### 7.3.4.3 Cultivo de células Sf9

Las células Sf9 se cultivaron en suspensión en medio SF900 II (Invitrogen) libre de suero a 27°C en agitación a 110 rpm. Se cultivaron en matraces de 50, 100, 500 mL y 1L con

un volumen de trabajo de 1/5 a 1/6 del volumen del matraz. La concentración celular se determinó con el contador electrónico de partículas (Coulter Multisizer II) y la viabilidad celular con azul de tripano en la cámara de Neubauer. El mantenimiento de las células se realizó cada tercer día a una concentración de  $0.6 \times 10^6$  cel/ mL.

#### **7.3.4.4 Transfección de células Sf9 con bácmidos recombinantes**

Una vez que se confirmó la presencia del transgén y el sentido del transgén en el bácmido recombinante, las células Sf9 se transfectaron para la producción de baculovirus recombinante. En una placa de 6 pozos se sembraron  $1.5 \times 10^6$  células Sf9 en 2 mL de medio Grace's durante 1 h para permitir su adherencia. Mientras tanto, se preparó la mezcla de transfección de la siguiente forma: Tubo 1: 1  $\mu$ g de bácmido recombinante estéril, 20  $\mu$ L de FlyFectiN (lípidio catiónico) y 100  $\mu$ L de medio Grace's. Tubo 2: El mismo contenido del tubo 1 excepto que se utilizaron 2  $\mu$ g de bácmido. Tubo 3: 120  $\mu$ L de medio Grace's (control negativo). La mezcla se incubó por 30 min a temperatura ambiente (TA). Transcurrido el tiempo, a las células se les colocó gota por gota la mezcla de transfección y se incubaron por 4 h en agitación constante a TA. Después, se adicionó 2 mL de medio SF900-II y 20  $\mu$ L de antibiótico/antimicótico (Sigma). Las células se incubaron por 96 h a 27°C en ambiente húmedo. Tras finalizar el periodo de incubación, se recuperó el sobrenadante que contenía los baculovirus recombinantes, se suplementó con 1 % SFB, se protegió de la luz y se almacenó a 4°C.

#### **7.3.4.5 Ensayo en placa para aislar placas de baculovirus recombinantes**

El ensayo consiste en infectar las células con diluciones del baculovirus las cuales son cubiertas con medio semisólido que inmoviliza el baculovirus. De esta forma se evita que el baculovirus se disperse libremente. Transcurridos unos días se pueden ver zonas circulares transparentes, señal de que el virus ha lisado a la célula. Estas zonas se denominan placas y se asume que cada placa se formó a partir de un baculovirus.

Las células Sf9 fueron sembradas en una placa de 6 pozos,  $1.8 \times 10^6$  cel/ pozo en 2 mL de medio Grace's e incubadas a 27°C por 1 h para permitir su adherencia. Paralelamente se realizaron diluciones seriadas 1:10 del stock viral en 1 mL: 100  $\mu$ L del stock viral más

900  $\mu$ L de medio Grace's hasta la dilución  $10^{-5}$ . Se retiró el sobrenadante de cultivo de la placa y se colocaron 900  $\mu$ L de las diluciones anteriores, con la precaución de no despegar las células. La placa se incubó por 4 h a TA. Después se retiró el sobrenadante y se agregaron 3 mL por pozo de la siguiente mezcla atemperada a 37°C: 1 volumen de agarosa de bajo punto de fusión al 3%, 0.8 volumen de medio Grace's 2X y 0.2 volumen de SFB. Las cajas se incubaron a 27°C en ambiente húmedo por 96 h. Transcurrido el tiempo, se agregaron 2 mL de una segunda capa de agarosa compuesta por 1 volumen de agarosa al 1.2%, 0.8 volumen de medio Grace's 2X, 0.2 volumen de SFB y 0.02 volumen de rojo neutro al 1%. La caja se incubó por 4 h a 27°C en ambiente húmedo. Posteriormente, se identificaron las placas por la formación de halos incoloros. Las placas se colectan al picar el agar con una punta que se re-suspendió en 1 mL de medio Grace con 0.5 % SFB. Se realizó la primera ronda de amplificación de las placas aisladas al infectar las células *Sf9* en placa de 6 pozos e incubarlas por 96 h a 27°C. Esto con la finalidad de identificar que placa producía la proteína recombinante mediante Western blot.

#### **7.3.4.6 Generación de stocks de baculovirus recombinantes a partir de las placas aisladas**

Para la generación del banco maestro se infectaron 30 mL de cultivo de células *Sf9* a una concentración de  $0.6 \times 10^6$  cel/mL con 400  $\mu$ L del sobrenadante del pase cero. Después se incubaron en agitación por 96 h a 27°C y los sobrenadantes se obtuvieron por centrifugación a 800  $xg$  (rotor F34-6-38) por 10 min a 4°C. El sobrenadante, denominado pase 1 del stock de baculovirus, se suplementó con 2% SFB y se almacenó a 4°C protegido de la luz. Posteriormente, se generó el banco de trabajo al infectar un cultivo de 100 mL de *Sf9* a una concentración de  $1 \times 10^6$  cel/mL a MDI 0.1 UFP/cel durante 96 h. El sobrenadante cosechado se denominó pase 2 del stock de baculovirus.

#### **7.3.4.7 Titulación de stocks de baculovirus**

La titulación se llevó a cabo mediante un ensayo de viabilidad basado en la degradación de un compuesto de color, bromuro 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2-5difetil tetrazolio (MTT; Sigma Aldrich) por una deshidrogenasa mitocondrial presente en células viables. El

producto resultante, formazán, es una sal magenta insoluble en agua que permite cuantificar las células viables mediante un espectrofotometría. Debido a que el baculovirus es un virus lítico, la infección reduce el crecimiento celular y se espera que esta reducción sea dosis dependiente y pueda ser estimado midiendo la concentración celular viable usando MTT la cual se correlaciona con el título viral (Mena *et al.*, 2003).

### **a) Protocolo**

En una placa de 96 pozos se sembraron células *Sf9*, 9000 cel/ pozo en un volumen de 50  $\mu$ L, dos placas por cada baculovirus a titular. Paralelamente, se realizaron diluciones seriadas 1:10 del stock viral a titular en 1 mL: 100  $\mu$ L del stock viral más 900  $\mu$ L de medio Sf900 II hasta la dilución -10. Posteriormente, se agregaron 10  $\mu$ L de las diluciones por pozo. Cada dilución tiene dos columnas de 8 pozos, es decir 16 pozos por dilución. También se incluyeron dos columnas del stock de baculovirus sin diluir (10  $\mu$ L/ pozo) y dos columnas para células sin infectar (10  $\mu$ L de medio/ pozo). Las placas fueron incubadas por 6 días a 27°C en un ambiente húmedo. Transcurrido el tiempo, se agregaron 10  $\mu$ L/ pozo de la solución de MTT a 5 mg/mL. Las placas se incubaron durante 2 h a TA protegidas de la luz, en un agitador orbital. Para precipitar los cristales, las placas se centrifugaron por 10 min a 800 *xg*. Se retiró el sobrenadante y se agregaron 50  $\mu$ L/ pozo de DMSO para disolver los cristales. Por último, se midió la absorbancia a 570 nm en el lector de microplacas FLUOstar OMEGA (BMG, Labtech).

### **b) Cálculo del título viral**

Se obtienen los promedios de cada dilución junto con su desviación estándar y se ajustan al modelo tipo sigmoideo, logístico de cuatro parámetros a través de la siguiente ecuación:

$$Y = Y_0 + \frac{a}{1 + \left(\frac{X}{X_0}\right)^b}$$

Donde *Y* es la absorbancia, *Y*<sub>0</sub> es la absorbancia mínima (concentración celular viable mínima detectada), *a* es la absorbancia máxima (0% de respuesta), *X* es la dilución, *X*<sub>0</sub> es el valor de la dilución a la cual se observa el 50% de la respuesta a la infección viral y



b es la pendiente. El valor de  $X_0$  se sustituye en la siguiente ecuación, donde V es el volumen de virus empleado en cada dilución.

$$\frac{TCL_{50}}{mL} = \frac{1}{X_0V}$$

El valor obtenido se sustituye en la siguiente ecuación, donde se muestra la relación entre TCLD50/mL y la dosis infecciosa media (TCID/mL) (Mena *et al.*, 2003).

$$\frac{\text{LogTCID}_{50}}{mL} = 0.912 \left( \frac{TCLD_{50}}{mL} \right) + 1.674$$

Finalmente, para obtener el valor del título viral (ufp (unidades fomadoras de placa)/mL) se sustituye el valor de TCID<sub>50</sub>/ mL en la siguiente ecuación:

$$\frac{ufp}{mL} = \frac{TCID_{50}}{mL} * 0.69$$

#### **7.3.4.8 Cinéticas de producción de PPV ZIKV en células Sf9**

Se cultivaron 30 mL de células Sf9 a una concentración de  $0.8 \times 10^6$  cel/mL a 27°C, 110 rpm. Después de 15 h aproximadamente, las células alcanzaron una densidad de  $1.3 \times 10^6$  cel/mL y se infectaron con el stock maestro de baculovirus a una MDI de 1 y 0.1 ufp/cel. Como control positivo, se infectaron células Sf9 con baculovirus GPF a las mismas MDI. Los cultivos se incubaron a 27°C a 110 rpm durante el tiempo en que la viabilidad no fuera menor del 25%. Cada 12 h se tomaba muestra del cultivo. Una vez que se terminó la MDI y tiempo de cosecha se realizaron cultivos en un volumen mayor para la obtención de mayor cantidad de PPV ZIKV.

### **7.3.5 Desarrollo de línea celulares recombinantes en células de mamífero**

#### **7.3.5.1 Cultivo de HEK-293/ HEK-293T17**

Las células HEK-293 se cultivaron en adherencia con medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 y 5% al 5% CO<sub>2</sub>, 37°C en placas de 24, 12, y 6 pozos con un área de 1.9 cm<sup>2</sup>, 3.8 cm<sup>2</sup> y 9.5 cm<sup>2</sup>, respectivamente, así como en botellas de cultivo T25, T75, T225 (Corning) de acuerdo con los volúmenes de trabajo especificados por el proveedor.

### **7.3.5.2 Determinación de la dosis mínima de antibiótico**

En una caja de 6 pozos, se sembraron 40 000 células HEK-293 por pozo en 2 mL de medio DMEM al 10% de SFB a 37° C durante 24 h. Al día siguiente, a una confluencia de 20- 25 % se desechó el medio, se hizo un lavado con PBS, y nuevamente se colocó medio DMEM con 10% SFB más antibiótico G418 (Sigma-Aldrich): 200, 400, 800, 1000 y 2000 µg/mL para un volumen final de 2 mL por pozo a partir del stock de neomicina que corresponde a 8, 16, 32, 40 y 80 µL respectivamente. El cambio de medio con su respectiva dosis de antibiótico se realizó cada tercer día.

### **7.3.5.3 Transfección transitoria**

En una caja de 6 pozos se sembraron  $1 \times 10^6$  células HEK-293 por pozo en un volumen de 2 mL y se incubaron a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> por 24 h en un ambiente húmedo. Paralelamente, se prepararon las siguientes mezclas: Tubo 1: 250 µL de medio DMEM y 5 µl de lipofectamina LTX, Tubo 2: 2.5 µg de DNA plasmídico en 250 µL de medio DMEM más 2.5 µL del reactivo Plus reagent. La mezcla de DNA se colocó en el tubo 2 y se incubó por 10 min a TA. Transcurrido el tiempo, se retiró el sobrenadante y las células se lavaron con PBS, con precaución de no despegarlas. Posteriormente, se adicionó la mezcla DNA-lipofectamina, se incubó a TA 2 min y se adicionaron 500 µL de medio DMEM. Se incubó por 4 h a 37°C en un ambiente húmedo; transcurrido el tiempo, se incubaron con 2 mL de medio DMEM con 5% SFB.

Las cantidades por 1 cm<sup>2</sup> son:  $0.105 \times 10^6$  células, 0.52 µL lipofectamina:, 0.26 µg DNA, 0.26 µL Plus Reagent. Estas cantidades se extrapolaron para transfectar a mayor o menor escala.

### **7.3.5.4 Generación de la línea estable por el método tradicional**

En placa de 6 pozos se sembraron  $1 \times 10^6$  células HEK-293/pozo. Dos de los pozos se transfectaron con el plásmido pcDNA 3.1 (+). Al día siguiente se inició la selección con antibiótico con la dosis mínima de neomicina determinada previamente: Pozo 1: Transfectado más antibiótico; pozo 2: Transfectado sin antibiótico; pozo 3: No transfectado más antibiótico; pozo 4: sin antibiótico y sin transfectar. Cada tercer día se cambiaba el medio con o sin antibiótico. Finalmente, los pellets y sobrenadantes fueron analizados por Western blot. Las células del pozo 1 se expandieron a formatos T75.

### **7.3.5.5 Ensamblaje del lentivirus**

Para el ensamblaje del lentivirus se realizó la transfección transitoria de los vectores lentivirales de tercera generación en las células empaquetadoras (HEK293T/17). Los vectores lentivirales utilizados fueron: pMDLg/pRRE, pMD.G, pRSV-REV (Adgene; número de plásmido #12251, #12259, #12253 respectivamente) y el vector de transferencia correspondiente (pLV-F-H1 $\alpha$ -ZIKV o pLV-F-H1 $\alpha$ -GFP). La transfección se realizó con: *Lipofectamine 2000 Transfection Reagent* (Invitrogen) y PEI (Polietilamina) (lineal, masa molecular de 25 000 Da) (Polysciences, Inc.) en experimentos independientes.

Se cultivaron células HEK-293T/17 a una concentración de  $0.45 \times 10^6$  cel/mL en caja Petri para cultivo celular de 10 cm de diámetro a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante 24 h. Se sembraron 5 cajas, el procedimiento se realizó por cada caja. Al día siguiente se mezcló en el tubo 1: 2.5 mL de medio DMEM, 33.9  $\mu$ L de PEI (1.5  $\mu$ L por cada microgramo de DNA) o 100  $\mu$ L de lipofectamina (4.4  $\mu$ L por cada microgramo de DNA); se dejó reposar por 5 min. En el tubo 2 se mezcló 2.5 mL de medio DMEM, 2.5  $\mu$ g pRSV-REV, 3.6  $\mu$ g pMD.G, 6.5  $\mu$ g pMDLg/pRRE y 10  $\mu$ g del vector de transferencia. Después, el contenido del tubo 1 y 2 se mezclaron e incubaron por 20 min a TA. Transcurrido el tiempo, se retiró el medio DMEM de las células HEK-293 y se agregó la mezcla de PEI-DNA o lipofectamina-DNA a las células gota a gota. Se dejaron incubando por 4 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> (período de transfección). Finalmente, se retiró el medio de cultivo con los complejos lípido-DNA y se adicionaron 10 mL de DMEM con 10% SFB. Las células se incubaron nuevamente durante 48 h a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>.

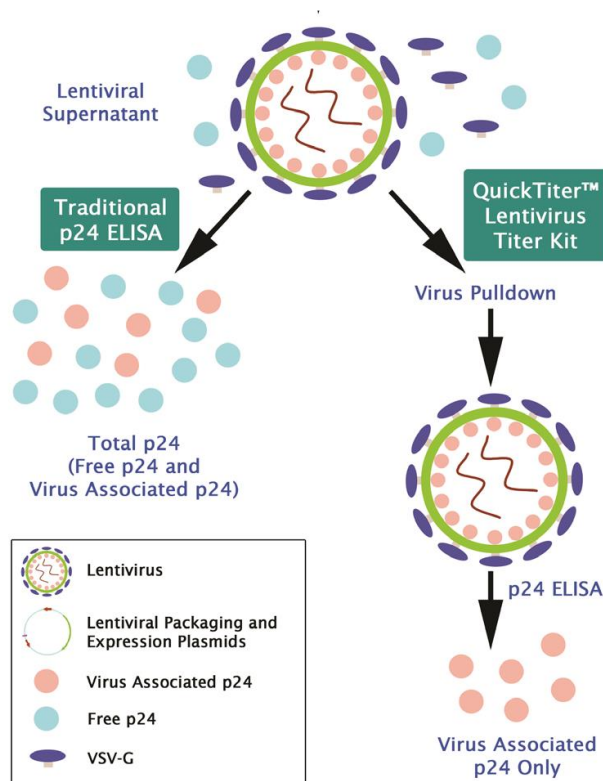
### **7.3.5.6 Cosecha y concentración de partículas lentivirales**

El sobrenadante que contenía las partículas lentivirales (LP) se centrifugó a 200 x g por 10 min con la finalidad de descartar células despegadas. Se descartó el pellet y diez mililitros del sobrenadante fueron alicuotados en tubos de 1 mL y congelados a -70°C. El volumen restante fue ultracentrifugado a 40 000 rpm en rotor Ti 90, 0000 3 h a 4°C. Se descartó el sobrenadante, se dejaron secar los tubos y el pellet que contenía las LP se re-suspendió en medio DMEM con 100 veces menos del volumen del que se partió. Los

tubos se almacenaron por 24 h a 4°C con la finalidad de disolver el pellet las LP. Al día siguiente, las LP se resuspendieron suavemente con la micropipeta y se almacenaron a -70°C.

### 7.3.5.7 Determinación del título de lentivirus por ELISA

Para calcular el título viral se utilizó el *kit QuickTiter lentivirus Titer (Lentivirus- Associated HIV p24, Cell Biolabs)* que cuantifica sólo la proteína p24 asociada al core de las partículas lentivirales, descartando aquella que se encuentra libre.



**Figura 15.** Esquema del fundamento del kit QuickTiter™ Lentivirus Titer (Cell Biolab).

#### a) Preparación de la curva estándar

Se prepararon diluciones de la muestra estándar del antígeno p24 HIV-1 de 100 ng/mL a 1 ng/mL por diluciones seriadas con el stock de proteína p24 y el diluyente como se muestra en la siguiente tabla:

Tubo	Proteína p24 estándar (μL)	Diluyente (μL)	p24 (ng/mL)
1	10	990	100
2	500 del tubo 1	500	50
3	500 del tubo 2	500	25
4	500 del tubo 3	500	12.5
5	500 del tubo 4	500	6.25
6	500 del tubo 5	500	3.13
7	500 del tubo 6	500	1.56
8		500	0

Cada tubo se mezcló por inversión y se incubó por 30 min a 37°C.

#### **b) Preparación e inactivación de las muestras lentivirales**

Se tomó 1 mL del stock LP y 1 mL de medio DMEM con 10% SFB (control negativo); a cada tubo se agregó 10 μL de ViraBind (reactivo A), se mezcló por inversión y se adicionó 10 μL de ViraBind (reactivo B), nuevamente se mezcló por inversión. Los tubos se incubaron por 30 min a 37°C. Transcurrido el tiempo, las muestras fueron centrifugadas a 13, 000 xg por 5 min a TA se eliminó el sobrenadante y el pellet se disolvió en 250 μL de diluyente. Se incubaron por 30 min a 37°C para inactivar los virus.

#### **7.3.5.8 Ensayo de ELISA**

Cada muestra de lentivirus a analizar, el standard de p24 HIV, el blanco y control negativo se analizó por duplicado. Se tomaron 100 μL de las muestras tratadas y se colocaron en la placa previamente sensibilizada con anticuerpo anti-p24 provisto en el kit. La placa se almacenó a 4°C OVN. Se desechó su contenido y la placa se lavó tres veces con 250 μL de solución de lavado por pozo. Después se adicionaron 100 μL de anticuerpo monoclonal anti-FITC conjugado con HRP diluido 1:1000, se incubó por 1 h a TA en agitación. Nuevamente se retiró el contenido y se lavó tres veces con 250 μL de solución de lavado. A continuación, se adicionaron 100 μL de sustrato a cada pozo y se incubó a TA de 2 a 30 min con la precaución de no llegar al punto de saturación. La reacción enzimática se detuvo con 100 μL de la solución de paro (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 N). Inmediatamente se midió la absorbancia a λ= 450 nm en el lector de microplacas *Mutiskan* (Thermo Fisher).

### 7.3.5.9 Cálculo del título viral

El título del lentivirus se determinó a partir de la concentración de la proteína p24 mediante una regresión lineal de la curva de absorbancia del estándar de la proteína.

Posteriormente, se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\text{Concentración de p24} \left( \frac{\text{ng}}{\text{mL}} \right) = \text{p24} \left( \frac{\text{ng}}{\text{mL}} \right) * \text{Factor de dilución} * \frac{0.250\text{mL}}{1\text{mL}}$$

Dado que hay aproximadamente 2000 moléculas de p24 por cada LP, entonces 1LP contiene:

$$\frac{2000 * 24 * 10^3}{6 * 10^{23}} \text{ g de p24} = 8 * 10^5 \text{ pg de p24}$$
$$\text{o } 1 \text{ ng de p24} = 1.25 * 10^7 \text{ LP}$$

A partir de la concentración de p24 se puede intuir el título de vectores lentivirales adecuadamente empaquetados, 1 UT (unidad de transducción) equivale a 100 a 100 LP<sup>3-5</sup> por tanto:

$$\frac{10^6 \text{ UT}}{\text{mL}} = \frac{10^{8-9} \text{ LP}}{\text{mL}} = 8 \text{ a } 80 \frac{\text{ng}}{\text{mL}}$$

### 7.3.5.10 Determinación del título viral por citometría de flujo

Se determinó el título viral de las LP adecuadamente empaquetadas y por ende infecciosas de LP de GFP concentrado y sin concentrar (control positivo), extrapolándolo para el título de las LP de ZIKV, al translucir las células HEK-293 T/17 y cuantificar el porcentaje de células positivas fluorescentes.

Se sembraron las células HEK-293 T/17 en medio DMEM con 10% de SFB a una densidad celular de 35 000 cel/mL, 100 µL por pozo en una placa de 96 pozos considerando tres columnas por muestra de LP a analizar y una columna para realizar recuento de tiempo cero. La placa se incubó por 24 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, se realizó el conteo del tiempo cero. A la par se realizaron diluciones seriadas 1:10 del stock a titular: se colocaron 20 µL stock viral + 180 µL DMEM hasta la dilución 10<sup>-7</sup>. Se retiró el sobrenadante de cultivo de la placa y se agregaron 50 µL de las diluciones

anteriores teniendo precaución de no despegar las células. Se incubaron las células a 37°C 5% CO<sub>2</sub> por 24 h. Transcurrido el tiempo, se retiró el sobrenadante de cada pozo y se incubaron con 200 µL de DMEM con 10% SFB a 37 °C por 96 h. Posteriormente, se despegaron las células de cada pozo con tripsina neutralizándola con PBS. Cada pozo se analizó por citometría de flujo donde se contaron el número de células fluorescentes. Solo la dilución que produjo de 2 a 20% de células fluorescentes se consideró para el cálculo del título viral. Debajo del 2%, el equipo FACS no es suficientemente preciso y confiable para determinar el número de células fluorescentes. Arriba del 30% la posibilidad de que una célula GFP positiva haya sido transducida dos veces incrementa significativamente, resultando en la sobrestimación del título viral. Una vez determinada la dilución a utilizar, se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Título viral} \left( \frac{UT}{mL} \right) = \% \text{ de células GFP positivas} * \text{número de células transducidas} * \text{volumen de transducción} * \text{factor de dilución}$$

#### **7.3.5.11 Transducción de las células HEK-293T/17**

Las células HEK-293T/17 fueron transducidas con las LP producidas anteriormente con la finalidad de obtener una línea celular estable. Para ello, se cultivaron las células HEK-293 a una concentración de 3x10<sup>4</sup> cel/mL y se incubaron OVN a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Al siguiente día, las LP se descongelaron en hielo al volumen a utilizar. Se retiró el medio de cultivo y se adicionó la cantidad de LP requerida según la MDI deseada en un volumen final de 1 mL. Las células con los LP se incubaron a 37°C, 5%CO<sub>2</sub> por 12 a 16 h. Después se retiró el sobrenadante que contiene las LP se adicionó medio DMEM con 10% SFB y se incubaron 72 h a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. El siguiente paso fue la presión de selección.

#### **7.3.5.12 Selección de las células HEK-293 T/17 transducidas**

La presión de selección se realizó gradualmente al aumentar la concentración de antibiótico. Una vez que las células eran resistentes a esa concentración se realizó un subcultivo aumentando la dosis de antibiótico. En el transcurso de la selección se cambió el medio de cultivo con antibiótico mínimo cada tercer día o máximo 1 semana según el

porcentaje de confluencia. Las dosis ocupadas abarcaron desde 1 hasta 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de puromicina dependiendo del porcentaje de expresión de la proteína recombinante y de la viabilidad celular.

Análisis de la expresión de proteína recombinante por FACS de las líneas seleccionadas  
Se cultivaron las líneas generadas en placa de 6 pozos a una concentración de  $0.3 \times 10^6$  cel/mL, 3 mL por pozo. Al siguiente día se hizo el recuento celular, se tomó el volumen correspondiente a 600, 000 células totales y se colocaron en un tubo Eppendorf. Se llevó a un volumen final de 1 mL con PBS 1X para lavar el suero. Los tubos fueron centrifugados 10 min a 1000 rpm (microcentrifuga Eppendorf). Se descartó el sobrenadante y se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de paraformaldehído al 4%. Las células se resuspendieron e incubaron por 20 min a TA. Después se lavaron por inversión con 1 mL de PBS, se centrifugaron a 1000 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante. Se repitió el paso de lavado dejando un volumen de aproximadamente 100  $\mu\text{L}$ . Se agregaron 20  $\mu\text{L}$  de una solución de anti-E ZIKV diluido 1:500 (dilución final sobre las células 1:5000) en amortiguador de permeabilización (PBS, Tween-20 0.2% v/v, BSA 0.2% p/v), se re-suspendió el pellet celular e incubó por 30 min a TA. Se lavó con PBS, se retiró el sobrenadante dejando 100  $\mu\text{L}$  de volumen remante. Enseguida, se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de la solución de anti-ratón conjugado con AlexaFluor 568 1:500 (dilución final sobre las células 1/5000) en amortiguador de permeabilización, se re-suspendió el pellet y se incubó por 30 min a TA (protegido de luz). Se lavó dos veces con PBS y finalmente se resuspendió en 1 mL de PBS para su análisis por citometría.

#### **7.3.5.13 Generación de clones**

El clonado celular de las líneas obtenidas se realizó por el método dedilución límite (Freshney, 2000). Se sembraron 8 cajas de 96 pozos a una suspensión celular de 5 cel/mL a una razón de 200  $\mu\text{L}$  por pozo en medio DMEM con 25% de medio metabolizado y 20% SFB. El clonado se considera efectivo cuando se observa crecimiento a lo sumo en el 30% de los pozos sembrados con una sola célula. Los pozos que presentaron de una a tres clones se seleccionaron y amplificaron. Para ello, se utilizaron sucesivamente



placas de 6 y 24 pozos y frascos T25, hasta llegar a obtener una cantidad suficiente de células de cada clona para su crio-preservación y análisis.

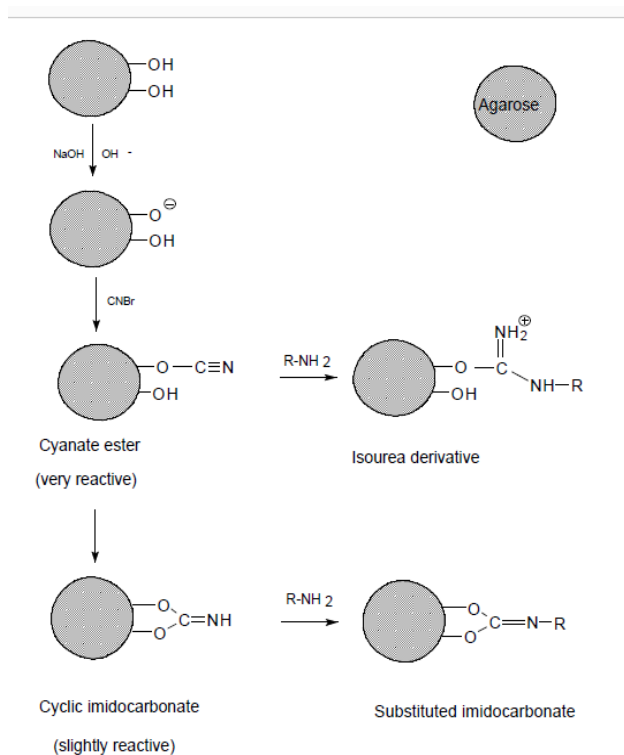
### **7.3.6 Metodología analítica para la caracterización de PPV-ZIKV**

#### **7.3.6.1 Purificación de PPV ZIKV por ultra centrifugación**

El procedimiento fue adaptado de Jensen *et al.* (2016). Los sobrenadantes de los cultivos de las células HEK-293T/17 y Sf9 fueron clarificados a 3200 *xg* en un rotor de columpio (modelo A462) por 60 min a 4°C. De forma paralela, se preparó la solución de sacarosa al 20% p/v en agua milliQ, la solución fue filtrada por membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ . Los tubos Ultra Clear™ y los tubos de la ultracentrífuga SW40Ti fueron esterilizados con UV por 20 min. Posteriormente, se preparó el colchón de sacarosa: se colocó en el fondo del tubo Ultra Clear™ 9 mL de sacarosa y sobre ésta, se colocaron cuidadosamente 30 mL de sobrenadante de cultivo. Los tubos fueron ultracentrifugados a 113, 602 *xg* en el rotor Beckman SW-40Ti por 3 h a 4°C. En este paso, las PPV atraviesan el colchón de sacarosa por su densidad. Enseguida el sobrenadante se removió de forma rápida y cuidadosa. Los tubos se colocaron boca abajo sobre un papel absorbente para secarlos. El pellet se re-suspendió en 1 mL de amortiguador HEPES 100 mM pH 7.9 con 50 mM de NaCl a 4°C. Después, las PPV resuspendidas fueron centrifugadas en una microcentrífuga Eppendorf a 16 000 *xg* en rotor de ángulo fijo modelo (F-45-18-11) a 15°C por 20 min con la finalidad de lavar las PPV. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en PBS pH 7.4 estéril. Las PPV fueron almacenadas a 4°C.

#### **7.3.6.2 Construcción de una resina de afinidad de sepharosa 4B AcM EDE1 C8**

El anticuerpo monoclonal (AcM) EDE1 C8 es un anticuerpo producido en el laboratorio que reconoce el epítipo EDE, interfaz del dímero de la proteína E de ZIKV. El AcM se unió a la resina de sepharosa 4B por enlace covalente al utilizar la resina activada con bromuro de cianógeno (CNBr). El CNBr en base reacciona con los grupos hidroxilos de la agarosa para formar éster de cianato o imidocarbonatos. Estos grupos reaccionan con aminas primarias del anticuerpo, que resultan en un enlace covalente con la matriz de agarosa en donde la estructura preferente es un imidocarbonato, sin carga neta (Figura 14).



**Figura 16.** Esquema de reacción de resina activada con bromuro de cianógeno y aminas primarias (Sigma).

### 7.3.6.3 Reacción de acoplamiento

Se disolvió 1 mg de AcM C8 anti-EDE E de ZIKV en el amortiguador de acoplamiento 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> con 0.5 M NaCl, pH 8.4. (5–10 mg AcM por mL de resina). Paralelamente, se hidrató y lavó 0.3 mg de resina activada con bromuro de cianógeno (Catálogo C9142, sigma) con 100 mL de HCl 1mM por 30 min. El sobrenadante se removió constantemente por filtración para eliminar la lactosa, debido a que puede interferir en la reacción de acoplamiento. El uso de HCl preserva la actividad de los grupos reactivos los cuales se hidrolizan a pH alto. Posteriormente, se lavó la resina con agua destilada, 5-10 volúmenes de columna, luego se lavó con el amortiguador de acoplamiento NaHCO<sub>3</sub>/NaCl (5 mL por gramo de resina) e inmediatamente se mezcló con el AcM en amortiguador de acoplamiento en un tubo Eppendorf de 5 mL. Cabe mencionar que los grupos reactivos se hidrolizan en solución básica. La mezcla de resina-AcM se mezcló por inversión 1 h a TA y posteriormente a 4 °C OVN. Al día siguiente, se lavó el AcM no unido utilizando amortiguador de acoplamiento NaHCO<sub>3</sub>/NaCl. Después se bloquearon los grupos sin

reaccionar con 0.2 M glicina pH 8.0 por 2 h a TA y se mezcló por inversión. Subsecuentemente, para eliminar la solución de bloqueo la resina se lavó con 10 VC de amortiguador de acoplamiento y después con 10 VC de amortiguador de acetatos 0.1 M pH 4 con 0.5 M NaCl. Se realizaron 5 ciclos de lavado alternados con amortiguador de acoplamiento (10 VC) y amortiguador de acetatos (10 VC). Posteriormente la resina se almacenó en PBS 1X con 1M NaCl de 2 a 8 °C con azida de sodio al 0.2% (p/v).

#### 7.3.6.4 Estandarización de la purificación de PPV con resina de afinidad C8 anti-EDE-E de ZIKV

La resina de afinidad de Sepharosa 4B AcM EDE1 C8 se utilizó para purificar las PPV producidas en el sistema de insecto-baculovirus y de mamífero. Se prepararon las soluciones listadas en la tabla 9 (solución 1-6) y el amortiguador de neutralización 1M de Tris pH 8 fueron filtradas por una membrana de 0.45 µm. La resina se colocó en una columna y se inició el proceso de purificación al equilibrar la resina con 15 VC de PBS pH 7.4. Posteriormente en un tubo Eppendorf de 5 mL se colocó la muestra que contenía las PPV ZIKV con la resina y se mezcló por inversión OVN a 4°C. Al siguiente día, las PPV se eluyeron de la resina con 3 volúmenes de columna (VC) de 0.1 M glicina pH 2.75. Las fracciones de 100 µL se colectaron en tubos eppendorf que contenían 20 µL de amortiguador de neutralización. Posteriormente la columna se lavó con PBS y se regeneró con 0.5 M de NaCl.

Tabla 9. Purificación de PPV con la resina Sepharosa 4B – AcM EDE1 C8			
Paso	Solución	CV	Fracciones colectadas
1	Equilibrio	PBS pH 7.4	15 CV
2	Muestra	PBS pH 7.4	2 mL OVN 4° C, inversión
3	Lavados	PBS pH 7.4	12 CV c/u 500 µL
4	Elución	Glicina 0.1M pH 2.75	3 CV c/u 100 µL
5	Lavado	PBS pH 7.4	3 CV c/u 1 mL
6	Regeneración	PBS con 0.5 M NaCl	15 CV

### **7.3.6.5 Tinción de plata**

#### **a) Se prepararon las siguientes soluciones:**

Solución de fijación: Para 60 mL, se agregaron 30 mL de metanol, 7.2 mL de ácido acético, 30 µL de formaldehído al 37% y se aforaron a 60 mL con agua milli Q.

Solución de lavado: Para 60 mL, se agregaron 30 mL de etanol y 30 mL de agua milliQ.

Solución de pretratamiento: Para 60 mL, se pesó 0.008 g de tiosulfato de sodio y se disolvió en 60 mL de agua milliQ. Se protegió de la luz.

Solución de impregnante: Para 60 mL, se pesó 0.12 g de nitrato de plata, se agregaron 450 µL de formaldehído al 37% y se disolvieron en 60 mL de agua milliQ.

Solución de revelado: Para 60 mL, se pesó 3.6 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 5 µL de formaldehído al 37%, 1.2 mL de solución de pretratamiento y se disolvieron en agua miliQ hasta un volumen final de 60 mL.

Solución de paro: Para 60 mL, se agregaron 30 mL de metanol, 7.2 mL de ácido acético, 30 µL de formaldehído al 37% y se disolvieron en agua milliQ hasta un volumen final de 60 mL.

#### **b) Protocolo**

El gel de poliacrilamida se incubó con la solución de fijación durante 1 h a TA en agitación constante. Posterior a la fijación, se realizaron tres lavados de 20 min con la solución de lavado. Después se adicionó la solución de pretratamiento, el recipiente se protegió de la luz e incubó durante 1 min a TA en agitación. Inmediatamente, se realizaron tres lavados de 20 s con agua. El gel se incubó con la solución impregnante durante 20 min a TA en agitación. Transcurrido el tiempo, se realizaron dos lavados de 20 s con agua y después se adicionó la solución de revelado; se agitó hasta que aparecieron las bandas. Inmediatamente se realizó un lavado con agua por 20 s. Por último, se adicionó la solución para detener la tinción de plata y se incubó durante 5 min a TA en agitación. Posteriormente fue escaneada en el equipo Chemidoc.

### **7.3.6.6 Western blot**

Se realizó un gel SDS-PAGE al 12% en condiciones reductoras, las muestras de los sobrenadantes (30 µL) más el control positivo proteína E (500 ng) recombinante de ZIKV fueron calentadas por 5 min a 98°C. Las proteínas fueron transferidas a una membrana

de PDV en condiciones húmedas en el amortiguador de transferencia (25 mM de Tris base, 192 mM de glicina y 20% v/v de metanol) por 1 h a 120 mV como se muestra a en la figura 5. La membrana fue teñida con rojo Ponceau (0.1% de rojo Ponceau, 5% de ácido acético) para corroborar la transferencia de proteínas. Se lavó la membrana con agua. La membrana fue bloqueada con 5% W/V de leche disuelta en TBS-Tween al 0.1% V/V (TBS-T) OVN a 4°C con agitación. La membrana se enjuagó con TBS-T por 10 min tres veces con agitación. Posteriormente la membrana fue incubada con el anticuerpo monoclonal anti-ZIKV Env 1:5000 (BioFront) diluido en TBS-T durante 1 h. Transcurrido este período, la membrana fue lavada con TBS-T 10 min por tres veces y fue incubada con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a HRP 1:5000 diluido en TBS-T. Por último, se repitieron los lavados y la membrana fue revelada con 750 µL de luminol en el equipo Chemidoc.

#### **7.3.6.7 Dot blot**

La formación de PPV se evaluó en primera instancia con el anticuerpo AcM EDE1 C8 que reconoce un epítipo conformacional en la interfaz del dímero de la proteína E. Se tomaron 20 µL de las muestras analizar y se diluyeron en PBS a un volumen de 100 µL o bien 200 µL para análisis de sobrenadantes. Las muestras fueron cargadas sobre una membrana de PVDF, previamente activada en metanol, en un equipo Bio Dot (Biorad, USA) conectado a una bomba de vacío. Posteriormente se colocó amortiguador de transferencia para enjuagar los pozos. Se aplicó vacío hasta que el amortiguador de transferencia fue completamente filtrado a través de la membrana. La membrana fue bloqueada con 5% W/V de leche disuelta en TBS-T OVN a 4°C con agitación. La membrana se lavó con TBS-T por 10 min tres veces en agitación. Posteriormente, la membrana fue incubada con el AcM EDE1 C8 a 27 ng/ mL diluido en TBS-T durante 1 h. Se repitieron los lavados y la membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-humano acoplado a HRP 1:5000 diluido en TBS-T durante 1 h. Por último, se realizaron nuevamente los lavados y la membrana fue revelada con 750 µL de luminol en el equipo Chemidoc.

#### **7.3.6.8 Ensayo de BCA**

La cuantificación de las proteínas se realizó mediante el ensayo del ácido bicinconínico (BCA) (Thermo Scientific™). El método se basa en la conversión de  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$  en condiciones alcalinas. El color púrpura de la reacción se da por la quelación de dos moléculas de BCA con un ion  $\text{Cu}^{+1}$ , por lo que la cantidad de  $\text{Cu}^{+2}$  reducido es función de la concentración de proteína.

Se preparó una curva estándar a partir del stock de albúmina de 2 mg/mL disuelto en PBS, haciendo diluciones seriadas en un rango de 320 a 10  $\mu\text{g/mL}$ . En una caja de 96 pozos se colocaron 20  $\mu\text{L}$  de las muestras y de la curva estándar por triplicado. Se incubaron con 200  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reactivo A: reactivo B (1:50) durante 30 min a 37°C. La absorbancia se midió a 562 nm en el lector de microplacas FLUOstar Omega (BMG, Labtech).

#### **7.3.6.9 Microscopía electrónica de transmisión (MET)**

Las PPV se visualizaron por MET, para ello se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de la muestra sobre una rejilla de cobre cubierta de carbón y se dejó fijar por 3 min. El exceso de muestra se retiró y se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de la solución de acetato de uranilo al 2% para teñir la muestra negativamente durante 3 min. El exceso de uranilo se eliminó con 10  $\mu\text{L}$  de agua milliQ; las muestras se secaron y finalmente se observaron en el microscopio Ziess EM900.

## 8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 CONSTRUCCIÓN DE QUÍMERA

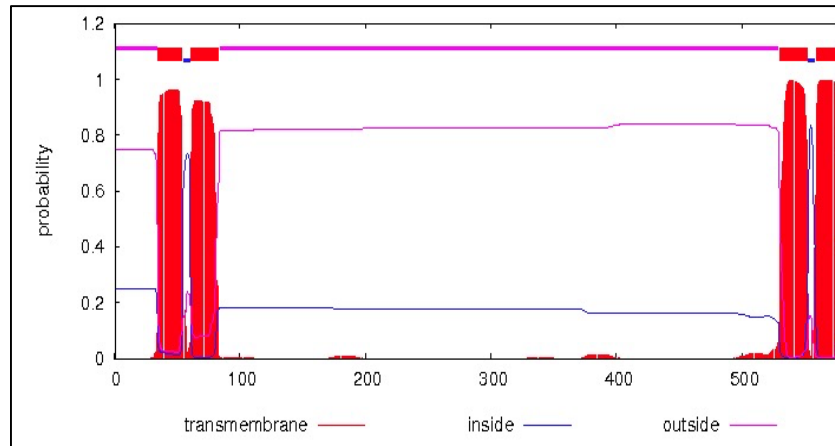
#### 8.1.1 Diseño

El diseño de la químera de ZIKV M-E (minus TM) JEV E (TM) se realizó al sustituir la región transmembrana de la proteína E de ZIKV por la región transmembrana de la proteína E de JEV, por la adición de la secuencia Kozak y la secuencia señal en el extremo 5'. A continuación, se describe los pasos seguidos para el diseño de la químera. Los genes que codifican para las proteínas M-E de la cepa BeH815744 de ZIKV (número de acceso KU365780) que corresponden a los aminoácidos 216-794 (Laroca *et al.*, 2016), fueron identificados y traducidos en el programa *ExPASy-Translate*. De igual manera el gen que codifican para la proteína E de JEV de la cepa SA14-14-2 (número de acceso: KY683775.1) corresponde a los nucleótidos 1- 1500 se tradujeron con *ExPASy-Translate* (Apendice I).

Posteriormente, en el programa TMHMM se predijo la región transmembranal (TM) de las proteínas M-E y E de ZIKV y JEV, respectivamente. El programa TMHMM se basa en el modelo oculto de Markov que determina parámetros desconocidos a partir de parámetro observables. El programa predice correctamente del 97 al 98% de hélices transmembranales y puede discriminar entre proteínas solubles y de membrana con una sensibilidad superior al 99%, permitiendo una predicción confiable de las proteínas integrales de membrana, por ello se ha utilizado para predecir secuencias transmembranas de genomas completos. TMHMM predice la hidrofobicidad, carga, tamaño de la hélice y restricción de asas citoplasmáticos y no citoplasmáticos (Krogh *et al.*, 2001).

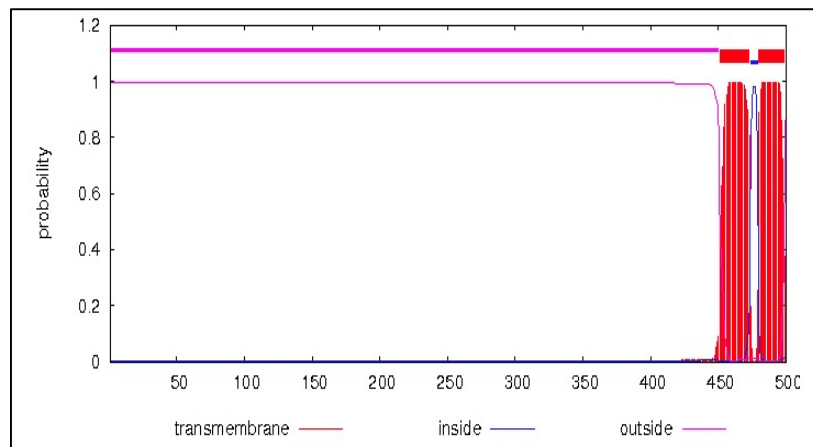
En la figura 17 se muestra la predicción de las regiones TM de la secuencia M-E (KU365780.1), donde se grafica el número de aminoácidos contra la probabilidad de que correspondan a una región TM. Se observa una región TM de la proteína M correspondiente a los aminoácidos 35 a 54 y 61a 83 (zona roja) conectadas por un asa de cinco aminoácidos. La proteína E muestra una región "outside" del aminoácido 84 al 529 y una región TM de 50 aminoácidos compuesta por dos regiones que abarcan del

aminoácido 530 a 552 y 559 a 578 conectadas por una asa de seis aminoácidos. La región “outside” corresponde al ectodominio (DI- DIII) y la región TM corresponden a TM<sub>1</sub> y TM<sub>2</sub>, como lo reporta Sirohi *et al.* (2016).



**Figura 17.** Predicción de regiones transmembranales de la secuencia M-E ZIKV en el programa TMHMM.

En la figura 18 se muestra la predicción de regiones TM de la proteína E de JEV. El aminoácido 1 al 450 corresponde a la región “outside” que hace referencia a los ectodominios y se observa una región TM de 50 aminoácidos compuesta por dos regiones que abarcan del aminoácido 451 a 473 y 480 a 500 unidos por un asa de 6 aminoácidos.



**Figura 18.** Predicción de regiones transmembranales de la secuencia E JEV en el programa TMHMM.

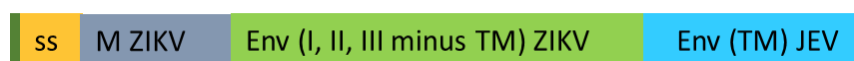


Posteriormente, se eliminó la región TM de 50 aminoácidos correspondiente a la proteína E de ZIKV y se seleccionó la región TM de JEV de 50 aminoácidos para sustituirla por la TM de ZIKV (Apéndice I).

En el extremo terminal 5' se añadió la secuencia Kozak, que facilita el reconocimiento del codón de inicio (AUG) durante el proceso de traducción en eucariotas, seguida de la secuencia señal (ss) reportada por Chang *et al.* (2000). La ss se utilizó en un plásmido de DNA-JEV (Chang *et al.*, 2000) así como en la secreción de WNV (Davis *et al.*, 2001) y DENV (Chang *et al.*, 2003) en células COS (fibroblasto de riñón de mono verde), sin embargo, las partículas de DENV no fueron secretadas eficientemente debido a que la región TM de DENV tiene mayor retención en retículo endoplásmico que la región TM de JEV (Hsieh *et al.*, 2008). También se demostró que la combinación de ss y el dominio TM de JEV en PPV de DENV hace más eficiente la secreción de DENV. Dado que la proteína E de ZIKV tiene una identidad del 55-60% con la proteína E de DENV 1-3 (Sirohi *et al.*, 2016), en comparación con otros *flavivirus* como JEV y WNV se supuso que las PPV ZIKV también podrían ser retenidas en el RE. Con la finalidad de hacer más eficiente la secreción de PPV ZIKV se decidió sustituir el dominio TM de ZIKV por el TM JEV y usar la secuencia ss (secuencia señal JEV reportada por Davis *et al.*, 2001; apéndice I).

En el extremo 3' terminal se le añadieron dos codones de stop, uno de ellos es el codón de ópalo (TGA), fuerte en las células Sf9 y las células HEK-293. Además, en los extremos 5' y 3' se añadieron las secuencias para el corte por las enzimas de restricción NheI (GCTAGC) y NotI (TAAGCGGCCGC).

La secuencia de la químera (ss, ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM)) contiene (Apéndice I): la secuencia Kozak, secuencia señal (ss), M-E (minus TM) de ZIKV, TM E de JEV y dos codones de stop, en 1818 nucleótidos, como se muestra a continuación:



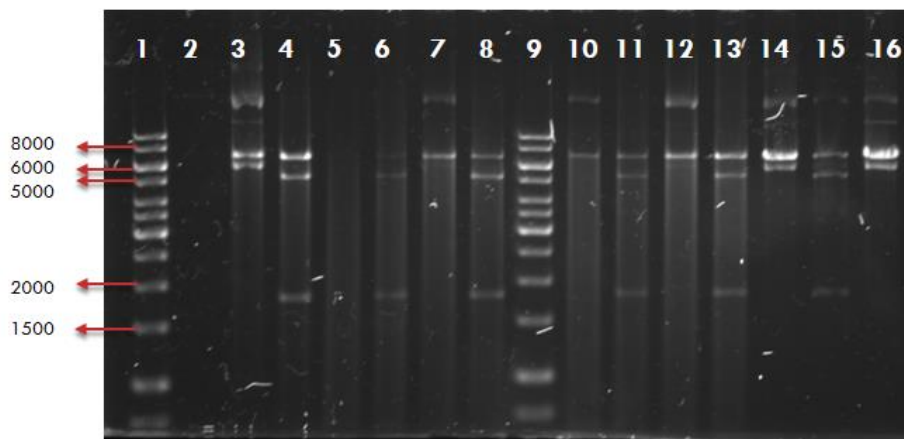
La secuencia diseñada fue sintetizada utilizando los servicios de una casa comercial en el vector pcDNA3.1 (+), debido a que no se contaba con el genoma del virus de JEV y ni

con la secuencia JE. El vector pcDNA 3.1(+) es un plásmido con alto nivel de expresión estable y transitoria en huéspedes mamíferos. Además, posee un marcador de selección para la generación de clonas estables y es un plásmido con alto número de copias.

### 8.1.2 Verificación de la secuencia

El plásmido 3.1 (+) con la químera ss\_ZIKV M-E minus TM\_JEV E (TM) fue analizado por doble digestión enzimática con NheI y NotI tomando seis colonias (C) al azar (1, 3, 5, 7, 9, 11) con la finalidad de verificar el peso del inserto.

La primera digestión realizada con la enzima NheI produjo la linearización del plásmido, mientras la segunda digestión con la enzima NotI dio lugar a la liberación del fragmento del inserto ss, ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM) correspondiente a 1818 pb así como a la parte restante del plásmido de 5351 pb que en conjunto suman 7169 pb (Figura 19). Como es posible observar, fue una digestión parcial, posiblemente porque las enzimas no están en condiciones óptimas. En las seis colonias elegidas al azar se observó la presencia del inserto (Figura 14). Para verificar si la secuencia es correcta, se secuenció el plásmido de las colonias 1 y 3.



**Figura 19.** Análisis de digestión enzimática del plásmido pcDNA 3.1 (+) ss, ZIKV M-E minus TM, JEV E (TM) por gel de agarosa al 1%. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: Plásmido 3.1 (+); Carril 3: C1 NheI; Carril 4: C1 NheI/NotI; Carril 5: C3 NheI; Carril 6: C3 NheI/NotI; Carril 7: C5 NheI; Carril 8: C5 NheI/NotI; Carril 9: Marcador de peso molecular; Carril 10: C7 NheI. Carril 11:C7NheI/NotI; Carril 12: C9 NheI; Carril 13:C 9 NheI/NotI; Carril 14: C11 NheI; Carril 15: C11 NheI/NotI; Carril 16: C1 NotI

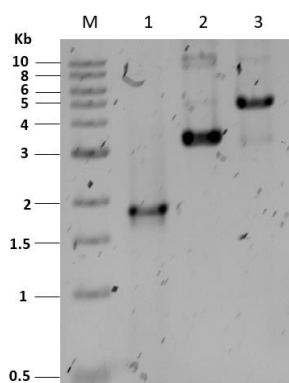
Se realizó el alineamiento de la secuencia esperada NheI\_ss\_ZIKV M-E minus TM\_JEV E (TM)\_NotI con las lecturas de secuenciación de plásmido pcDNA 3.1 (+) de la colonia 3 utilizando oligonucleótidos externos e internos (Apendice II).

Las secuencias obtenidas con los oligonucleótidos externos (oligonucleótidos Fw-Inserto y oligonucleótidos Rv-Inserto) muestran la inserción de una guanina en 800 pb. Se confirmó que esta inserción realmente no estaba presente a partir de las secuencias obtenidas de los oligonucleótidos internos (Fw-Inserto-Interno y Rv-Inserto-Interno) y con el análisis de los electroferogramas. De esta forma, se concluye que el inserto ss, ZIKV M-E minus TM, JEV E (TM) de la colonia 3 tiene un 100% de identidad con la secuencia esperada. Además, hay un 100% de identidad entre la secuencia del promotor del plásmido de la colonia 3 con la secuencia esperada, por lo que no habría problema en la transcripción del inserto. La colonia 1 se descartó porque presentó la inserción de una G, lo que recorre el marco de lectura.

## 8.2 PRODUCCIÓN DE PPV ZIKV EN EL SISTEMA DE INSECTO BACULOVIRUS

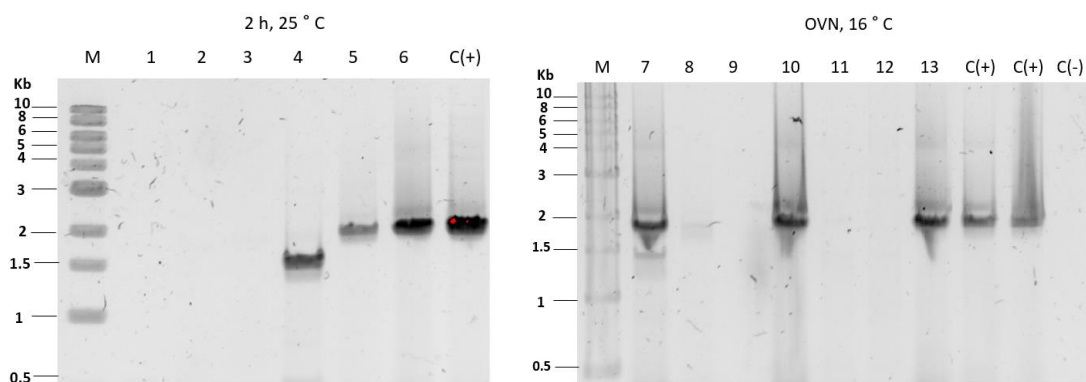
### 8.2.1 Clonación en el vector donador

La secuencia ss, ZIKV M-E minus (TM), JEV E (TM) (inserto) fue subclonada del plásmido 3.1 (+) al pFastBac1. Para ello se digirió del vector con las enzimas 5´NheI y NotI 3´, posteriormente se cambió el sitio de restricción NheI por BamHI al amplificar el inserto. La secuencia BamHI 5´ss\_ZIKV M-E minus TM\_JEV E (TM) NotI 3´ y el vector pFastBac1 fueron digeridos con las enzimas de restricción para su posterior ligación (Figura 20).



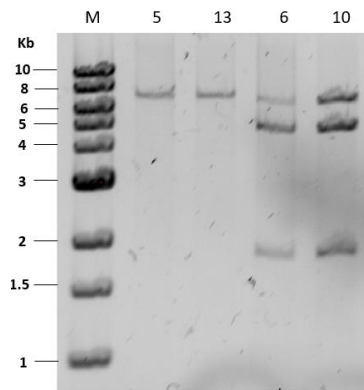
**Figura 20.** Análisis por enzimas de restricción del ss, ZIKV M-E (minus), JEV E (TM) y del vector pFastBac1. M: Marcador 1kb; Carril 1: Inserto digerido; Carril 2: pFastBac1, Carril 3: pFastBac1 digerido.

Trece colonias resultantes de la ligación fueron analizadas por PCR mediante la amplificación del inserto (Figura 21).



**Figura 21.** Análisis de amplificación de ss, ZIKV M-E (minus TM) JEV (TM) por PCR de colonia del producto de ligación, en gel de agarosa al 1%. Carril 1: Marcador 10kb. El carril corresponde al número de colonia. C (+): Control positivo, C (-): Control negativo.

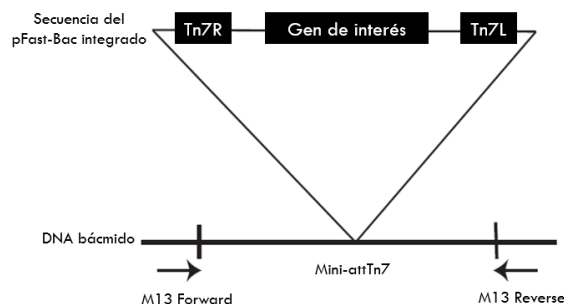
El DNA plasmídico de las colonias 5, 6, 10 y 13 se analizó mediante corte por enzimas de restricción BamHI y NotI (Figura 22). Se liberó un fragmento de aproximadamente 2kb a partir del DNA plasmídico de la colonia 6 y 10, peso correspondiente al inserto. El DNA plasmídico de la colonia 5 y 13 no liberó ningún fragmento. Posteriormente, se verificó la secuencia del inserto de la colonia 6 y 10. La colonia 6 presentó un 99.9 % de identidad con la secuencia esperada, mientras que la colonia 10 tuvo un 100% de identidad con la secuencia esperada. Por ende, se seleccionó el pFastBac1 de la colonia 10, que fue verificada por producto de PCR, por enzimas de restricción y secuenciación del inserto ss, ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM).



**Figura 22.** Análisis por corte de enzimas de restricción del DNA plasmídico pFastBac1-ss, ZIKV M-E (minus TM), JEV (TM) en gel de agarosa al 1%. M: Marcador de peso 10kb. Los carriles 5, 13, 6 y 10 corresponden al número de colonia.

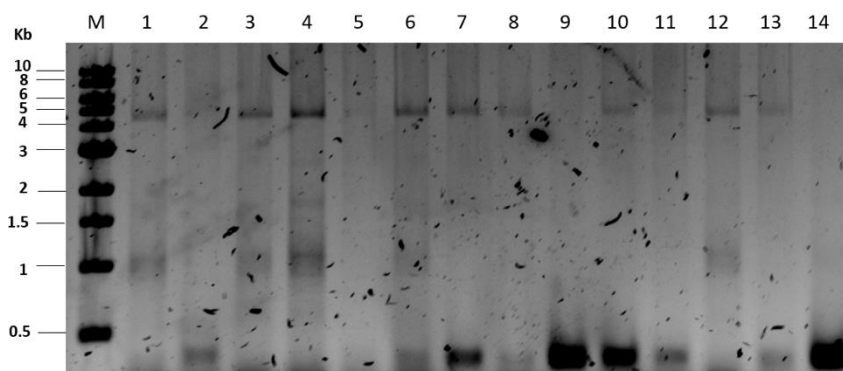
### 8.2.2 Generación y análisis del b́acmido recombinante

Los b́acmidos recombinantes se generaron al transformar bacterias DH10Bac con el pĺasmido pFastBac1 de la colonia 10 utilizando el sistema de expresi3n de baculovirus Bac to Bac. Se obtuvieron colonias con b́acmido recombinante (blancas) y sin b́acmido recombinante (azules) al utilizar X-gal como marcador de selecci3n. Trece colonias blancas recombinantes fueron analizadas por PCR para determinar la presencia del inserto ss, ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM) utilizando los oligonucle3tidos anti sentido M13. Los oligonucle3tidos M13 hibridan en regiones que flanquean los sitios de transposici3n MiniTN7 del b́acmido dentro de LacZ $\alpha$ , como se muestra en la figura 23.



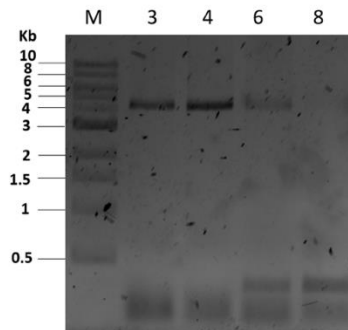
**Figura 23.** Diagrama de inserción del gen de interés para la generación del báculo recombinante. MiniTN7: elementos que permiten la transposición sitio-específica del gen de interés en el genoma de baculovirus.

El resultado de reacción de PCR se observa en el gel de agarosa al 0.8% en la figura 24. La transposición del inserto ss, ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM) en el báculo tuvo lugar en las colonias 3, 4, 5, 6, 8 y 12, donde se muestra un fragmento de 4100 pb (2300 pb báculo + 1800 pb inserto). En las colonias 2, 7, 9 y 10 se observa un fragmento de 300 pb perteneciente al báculo solo, donde no se produjo el evento de transposición que coincide con el producto de la colonia 14 correspondiente a una colonia azul utilizada como control negativo. En las colonias 1 y 12 hay dos productos uno de 4100 pb y un producto inespecífico de 1000 pb mientras en las colonias 11 y 13 mostraron una banda de aproximadamente 4.1kb y de 0.3kb lo que indica que las colonias blancas tenían alguna bacteria azul, contaminante, donde no hubo recombinación; por ende, las colonias 1, 11, 12 y 13 fueron descartadas.



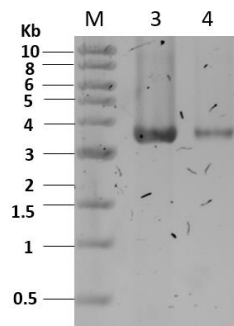
**Figura 24.** Análisis por PCR de colonia del báculo recombinante en gel de agarosa al 1 %. M: marcador 1kb, Carril 1 a 13: colonia blanca. Colonia 14: Colonia azul (control negativo).

Las colonias blancas 3, 4, 6, 8 fueron resembradas en placas LB-agar con X-gal, IPTG y los antibióticos de selección para confirmar su fenotipo. Posteriormente se extrajo el b acmido recombinante para corroborar por PCR la integración del gen de interés (Figura 25). Las colonias 6 y 8 mostraron una banda de aproximadamente 4.1kb y de 0.3 kb lo que indica que las colonias blancas tenían alguna bacteria azul, contaminante, donde no hubo transposición. Las colonias 3 y 4 mostraron solo una banda de 4.1kb, banda esperada del b acmido recombinante con transposición.



**Figura 25.** Análisis por PCR de ss, ZIKV M-E (TM), JEV (TM) a partir del b acmido recombinante en gel de agarosa al 1%. Carril 1: Marcador 1kb. Carril 3, 4, 6, 8 corresponden a las colonias blancas.

Luego se verificó la dirección del gen de interés en el b acmido recombinante mediante una PCR con el oligonucleótido Fw M13 y el oligonucleótido Rv del inserto de la colonia 3 y 4 seleccionadas (Figura 26)



**Figura 26.** Análisis por PCR de la dirección del transgén en el b acmido recombinante en gel de agarosa al 1%. M: Marcador de 1kb; Carril 3, 4 corresponden a la colonia.

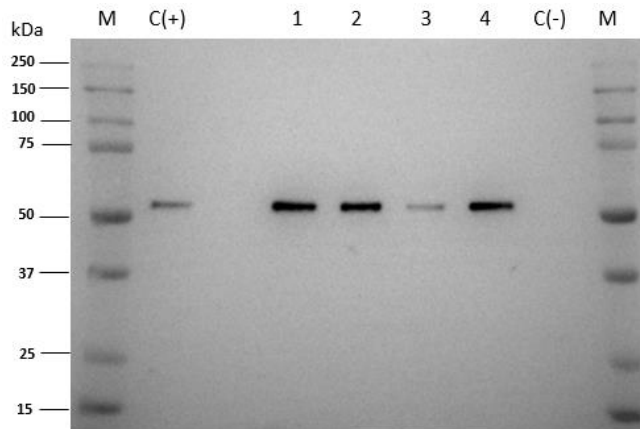
En ambas colonias se amplificó una banda de aproximadamente 3500 pb, peso esperado. Por ende, la colonia 3 y 4 contienen el transgén ss, ZIKV M-E (minus TM), JEV

E (TM) integrado en el genoma de baculovirus con el tamaño esperado y en la dirección correcta del mismo en el b acmido.

### 8.2.3 Transfecci3n de células de insecto *Sf9* y producci3n de baculovirus recombinante

Las células *Sf9* fueron transfectadas con el b acmido recombinante aislado de la colonia 3 que contiene el inserto (ss, M-E (minus TM) ZIKV, TM JEV) con la finalidad de generar baculovirus recombinante. Las células infectadas con baculovirus recombinante se pueden distinguir al microscopio ya que incrementan su diámetro celular, generalmente de un 30 a 40% (Palomares *et al.*, 2000).

El sobrenadante se cosech3 a las 96 h post-transfecci3n porque es en la fase tardía (24 a 96 h) del ciclo de vida del baculovirus donde se observa producci3n de la proteína recombinante que se encuentra bajo el promotor de *polh* (Palomares *et al.*, 2015). Para confirmar la identidad de la proteína ss ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM) expresada, se realiz3 un Western blot anti-proteína E de ZIKV del pellet y del sobrenadante de las células *Sf9* (Figura 27).



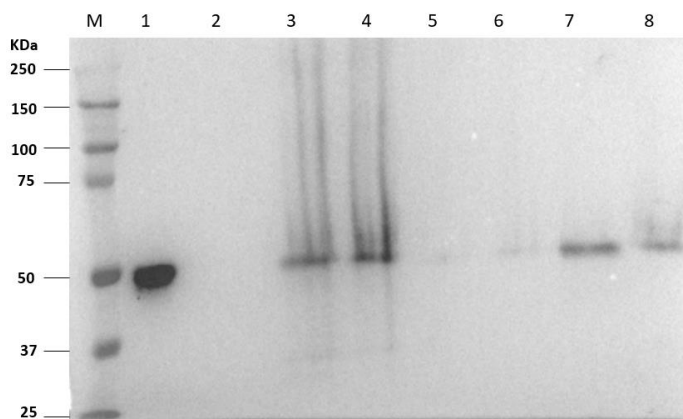
**Figura 27.** Análisis por Western blot anti-proteína E ZIKV de sobrenadante y pellet de células *Sf9* transfectadas. Carril 1: Pellet de células transfectadas con 1 µg de DNA; Carril 2: Pellet de células transfectadas con 2 µg de DNA; Carril 3: Sobrenadante de células transfectadas con 1 µg DNA (200 µL); Carril 4: Sobrenadante de células tranfectadas con 2 µg DNA (200 µL); Control (-).



En la figura 27 se muestra la expresión de la proteína E de 50 kDa, presente como se esperaba en el pellet y el sobrenadante de cultivos de las células *Sf9* transfectadas con 1 o 2 µg de DNA. Con 2 µg de DNA hubo mayor expresión de la proteína recombinante y por ende una mayor cantidad de partículas de baculovirus. Se trabajó con el baculovirus producido con 2 µg de bácmido. Dichos baculovirus corresponden al pase cero.

Posteriormente, se realizó el ensayo en placa con la finalidad de seleccionar y aislar un baculovirus recombinante productor de ss, ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM). En la primera selección se picaron tres placas con las que se infectaron células *Sf9* durante 4 h con un tiempo de incubación de 96 h. Mientras tanto la caja del ensayo en placa se incubó durante 48 h a 4°C, esperando una mayor visibilidad de las placas. Se picaron tres placas más (placas 4-6). Después de 96 h de incubación, se analizó el pellet celular por Western blot para la detección de la proteína E ZIKV (Figura 28).

Los baculovirus de las placas 1, 2, 5 y 6 (Figura 28) produjeron la expresión de la proteína ss-ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM) en las células *Sf9*. La placa uno y cinco de la primera y segunda selección mostraron mayor expresión. Estas placas fueron seleccionadas para la generación de los stocks de baculovirus. La placa 3 y 4 no mostró expresión de la proteína, esto pudiera ser porque no se picó de manera correcta la placa.



**Figura 28.** Análisis por Western blot anti-proteína E ZIKV en la selección del baculovirus recombinante. M: Marcador dual color, Carril 1: Control positivo ZIKV; Carril 2: Control negativo, células *Sf9* sin infectar; Carriles 3 a 8 corresponden a células *Sf9* infectadas con las placas virales 1 a 6, respectivamente.

Con la finalidad de amplificar la progenie viral, se generaron bancos virales al infectar sin conocer la multiplicidad de infección (MDI) células *Sf9* con el pase cero de las placas 1 y 5, en cultivos de 30 mL. A las 96 h se cosecharon los cultivos a una viabilidad de 20 y 18%, respectivamente. Ambos bancos fueron titulados mediante el ensayo de viabilidad reportado por Mena *et al.* (2003), como se describe en metodología. Los datos fueron analizados en el programa Sigma Plot. Se generó una curva sigmoide en donde el punto de inflexión corresponde a la dosis media letal del cultivo que da lugar al título viral (ufp/mL). Los resultados se resumen en la tabla 10. Se eligió el banco de la placa 1 para generar un banco de trabajo, ya que tiene un título ligeramente mayor. El banco maestro se generó al infectar las células *Sf9* a una multiplicidad baja, con una MDI de 0.1 ufp/cel e incubando durante 96 h, cosechando a 16% de viabilidad. El título obtenido fue 2.72E+08 ufp/mL. Los títulos generalmente obtenidos se encuentran en el rango de  $10^7$  a  $10^9$ , por lo que los títulos obtenidos en este trabajo están dentro de lo esperado.

La propagación de baculovirus para producir el banco maestro se hizo a una MDI baja con la finalidad de reducir el riesgo de generar partículas interferentes defectuosas (DIP), las cuales contienen deleciones en su genoma y se replican más rápido que el baculovirus completo, siempre y cuando se coinfecte con este. Otro factor importante que se tomó en cuenta para la producción del stock de baculovirus es mantener un número de pase por debajo de 6 con la intención de reducir la inestabilidad genética, ya que se va perdiendo el transgén a medida que aumenta el número de pases (Coen *et al.*, 1996; Kohlbrenner *et al.*, 2005; Palomares *et al.*, 2015). Por ello, el banco inicial y el de trabajo se encuentran en pases bajos, uno y dos, respectivamente.

<b>Tabla 10. Títulos de baculovirus</b>			
<b>Stock</b>	Placa	Pase	Título ufp/mL
<b>Maestro</b>	1	1	8.01E08
<b>Maestro</b>	5	1	7.44E8
<b>Trabajo</b>		2	2.72E08

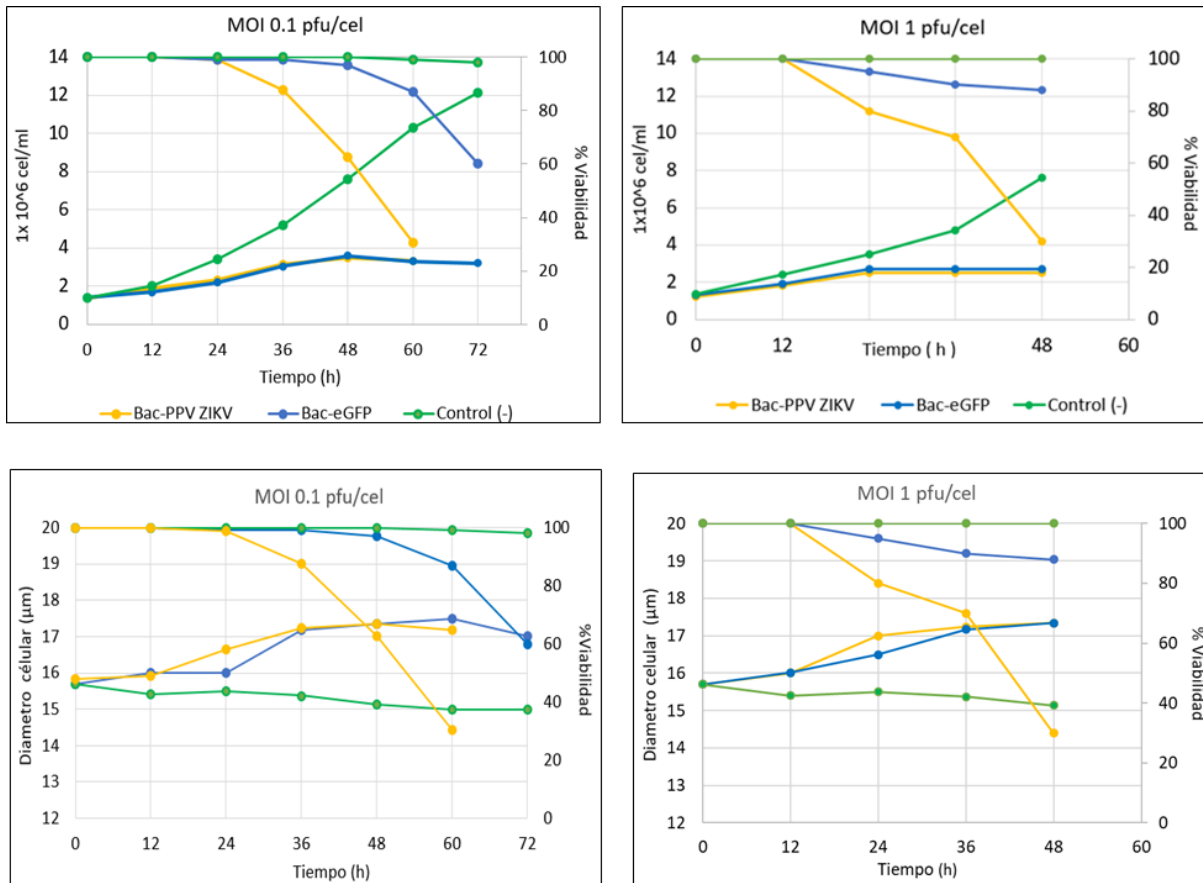
#### **8.2.4 Cinéticas de producción de ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM) en las células de insecto *Sf9***

La producción de ss, ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM) constó básicamente de dos etapas. Inicialmente, se cultivaron las células de insecto hasta obtener la concentración deseada (concentración celular al tiempo de infección, CCI). Después se agregó un volumen de baculovirus que contiene la cantidad de partículas infecciosas (ufp) necesarias para infectar el cultivo con la MDI (número de partículas virales infecciosas agregadas por cada célula en el cultivo, ufp/cel) deseada.

La estrategia de producción de proteínas recombinantes en el sistema de insecto baculovirus se basa en la manipulación de CCI, MDI y tiempo de cosecha (TDC), ya que tienen un impacto significativo en los rendimientos obtenidos (Chavez *et al.*, 2010; Palomares *et al.*, 2015). Por tal motivo, el efecto de estas variables fue evaluado. Se infectaron cultivos de *Sf9* por duplicado a dos MDI 1 y 0.1 ufp/cel, con el Bac-PPV ZIKV que contiene la secuencia ss, ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM); o con el Bac eGFP, utilizado como control positivo; y células *Sf9* sin infectar como control negativo (Figura 29). Se colectó muestra cada 12 h y se realizaron análisis de producción de proteína (Figura 30).

La CCI de los cultivos fue de  $1.3 \times 10^6$  cel/mL a 100% de viabilidad en un volumen de 40 mL. Para la cinética con MDI de 0.1 ufp/cel, a las 48 h, el diámetro de las células *Sf9* infectadas con el baculovirus eGFP y el Bac-PPV ZIKV aumentó a 17.34  $\mu\text{m}$ , mientras que las células del control negativo tenían un diámetro de 15  $\mu\text{m}$ , característica de las células infectadas (Palomares *et al.*, 2000). La concentración celular de ambos cultivos infectados se duplicó 2.5 veces y se estacionó a  $3.5 \times 10^6$  cel/mL hasta el término de la cinética, 3.5 veces por debajo del control negativo. Las células infectadas con Bac eGFP, a las 48h tenían una viabilidad del 97% mientras las infectadas con Bac-PPV ZIKV se encontraban alrededor del 60%; Al término de la cinética, 60 h, se encontraban en 87% y 30% de viabilidad, respectivamente. Para la cinética con MDI de 1 el diámetro celular presentó el mismo comportamiento que las células infectadas a MDI de 0.1 ufp/cel. A las 48 h, la concentración celular de los cultivos infectados se duplicó y se estacionó en  $2.6 \times 10^6$  cel/mL. Las células infectadas con Bac PPV ZIKV presentaban una viabilidad de

80% a las 24 h, a las 48 h la viabilidad disminuyó hasta 30%, tiempo en que cosecharon los cultivos, mientras el cultivo Sf9 infectado con Bac eGFP se encontraba en 90% de viabilidad.



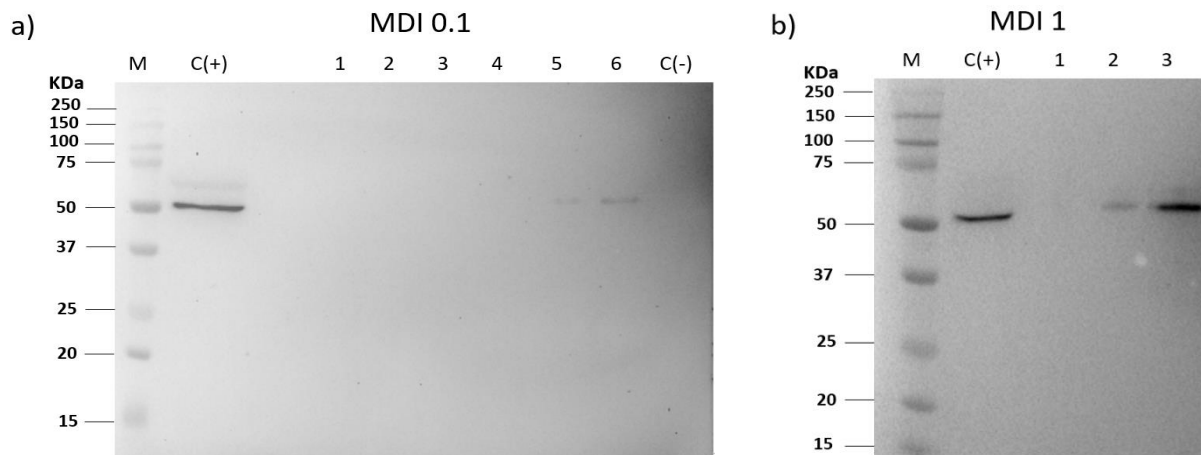
**Figura 29.** Cinética de células Sf9 infectadas a MDI de 1 y 0.1 ufp/cel de los Bac PPV ZIKV (amarillo), Bac GFP (azul) y células sin infectar (verde). Cada cinética se realizó por duplicado. Gráficas superiores: Células totales y viabilidad contra tiempo. Gráficas inferiores: Promedio del diámetro de las células y viabilidad contra tiempo.

En general, la concentración celular máxima alcanzada fue menor en los cultivos infectados con la mayor MDI. El incremento de la concentración celular a las 48 h en relación con las condiciones iniciales fue 2.5 veces para los cultivos infectados con 0.1 ufp/cel y de 2 veces para los cultivos infectados a 1 ufp/cel. En contraste, los cultivos del control negativo duplicaron su concentración cada 24 h lo que indica que la infección con baculovirus provocó la disminución del crecimiento celular. El menor crecimiento de los cultivos infectados a mayor MDI de debe a la infección de un número mayor de células

en el cultivo, las que dejan de crecer. Usando una MDI de 1 ufp/cel, el 37% de células son infectadas y el 26% utilizando una MDI 0.1 ufp/cel, esto según la distribución de Poisson que describe la probabilidad (p) de que una célula sea infectada por al menos un virus (x):  $P(x) = \left[ \frac{MOI^x}{x!} \right] e^{-MOI}$ , suponiendo que la infección por cada virus es un evento independiente y que la infección primaria es simultánea (Palomares *et al.*, 1999, Palomares *et al.*, 2012). Lo ideal hubiese sido utilizar una MDI de 5 ufp/cel o 10 ufp/cel, ya que el 91% y 99 % corresponden a células infectadas, sin embargo, tan solo a una MDI de 1 ufp/cel hubo una disminución drástica de la viabilidad como se discute más adelante. Además, los cultivos a la mayor MDI mostraron un rápido descenso de la viabilidad a partir de las 24 h postinfección, mientras que el descenso de la viabilidad inició a las 36 h en cultivos infectados a menor MDI.

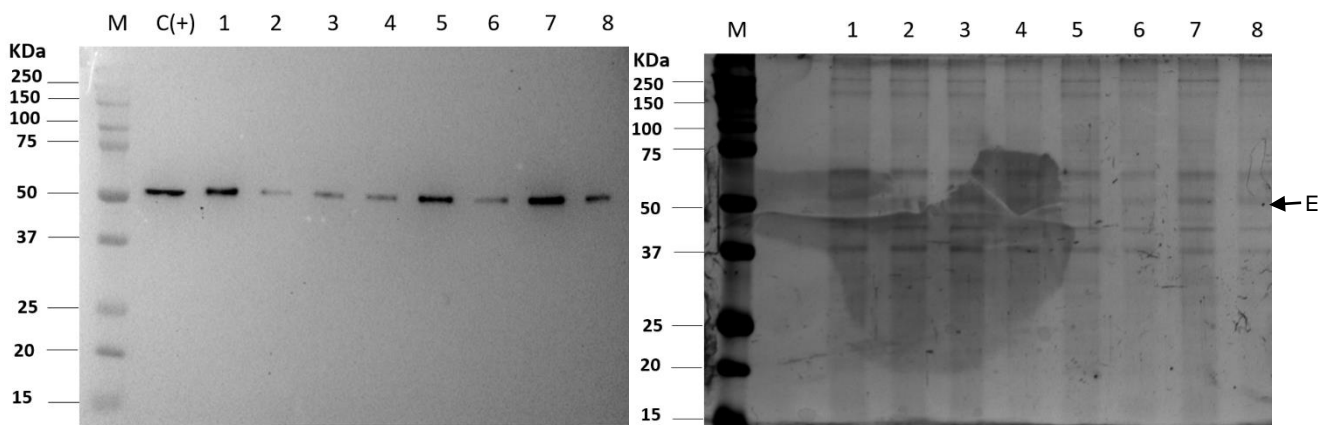
El limitado crecimiento y disminución de la viabilidad son provocados por el control que el baculovirus ejerce sobre las células al promover la síntesis de las proteínas virales a expensas de los celulares (O'Reilly *et al.*, 1994; Palomares *et al.*, 2006). Además, cabe hacer notar que la disminución drástica de la viabilidad de las células *Sf9* infectadas con el Bac PPV ZIKV fue mayor que con el control Bac eGFP. Esto muy probablemente se debe a al tipo de proteína expresada (eGFP), intracelular, o bien por PPV de virus no envueltos con una capa (Sevilla, 2018) o multicapa (Palomares *et al.*, 2012) en comparación con PPV de virus envuelto, extracelulares con dos dominio transmembranales de la proteína E y M. Generalmente las cinéticas de infección de células *Sf9* a MDI de 1 ufp/cel duran de 72 a 120 h con viabilidad entre 40 a 25%, y a MDI de 0.1 ufp/cel, de 40 a 25% de 72 a 120 h para PPV de virus no envuelto (Chávez *et al.*, 2010).

Posteriormente, el sobrenadante de las muestras de cultivo se procesó y cuantificó para su análisis por Western blot para la proteína E de ZIKV (Figura 30). La expresión de proteína E se vio afectada por la MDI y el tiempo de cosecha. Se observó mayor expresión de proteína en el sobrenadante del cultivo infectado a MDI de 1 que a MDI de 0.1 ufp/cel, a las 48 y 60 h post infección, respectivamente.



**Figura 30.** Análisis por Western blot anti-proteína E ZIKV de las cinéticas de infección. a) MDI 0.1. Carril M: Marcador dual color, C (+): Control positivo, Carriles 1 a 6 Sobrenadantes de cultivo a las 0, 12, 24, 36, 48, 60 h post-infección, respectivamente. C (-): control negativo. b) MDI 1: Carril1: Marcador dual color, Carril 2: Control positivo, Carril 3 a 5 sobrenadante de cultivo de las 0, 24, 48 h post infección. Cada pozo contiene 50  $\mu\text{g}$  de proteína total.

Las PPV de ZIKV producidas en el sobrenadante del cultivo de células *Sf9* se concentró por colchón de sacarosa al 20% (Jensen *et al.*, 2016.) y se cuantificó para su posterior análisis. Se detectó mayor cantidad de proteína a MDI de 1, 718.54  $\mu\text{g}$ , mientras que a MDI de 0.1 se obtuvo 386.25  $\mu\text{g}$ . Posteriormente, la proteína E se identificó por Western blot y por densitometría de gel teñido con plata se cuantificó el grado pureza, el cual corresponde al 20% para ambas MDI (Figura 31).



**Figura 31.** Análisis Western blot anti-proteína E ZIKV y tinción de plata de las PPV de ZIKV concentradas por colchón de sacarosa de las cinéticas de infección. a) Western Blot

b) Tinción plata: M: Marcador dual color; C (+): control positivo. MDI 0.1: Carril 1: 1 µg; Carril 2, 3 y 4: 500 ng. MDI 1: Carril 5: 1 µg; Carril 6, 7 y 8: 500 ng.

Finalmente, se recuperaron 1.1 µg de proteína E/mL en el sobrenadante de cultivo en las células *Sf9* infectadas a MDI de 0.1 y 2.4 µg de proteína E/ mL de cultivo a 1 MDI.

Por tanto, las condiciones de infección que resultaron en mayor rendimiento de proteína ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM) fueron a una MDI 1 ufp/cel en CCI de  $1.3 \times 10^6$  cel/mL a un TCD de 48 h.

### **8.2.5 Purificación de las PPV ZIKV**

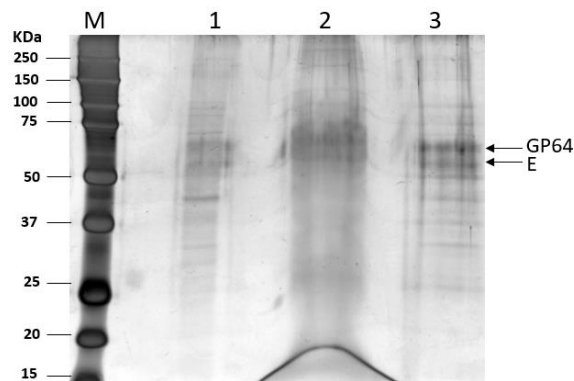
El baculovirus está presente en grandes cantidades en el sobrenadante de los cultivos infectados (Plascencia-Villa *et al.*, 2011) y es posible monitorear su presencia por GP64 ( $pI$  teórico 5.5), glicoproteína de envoltura principal de los baculovirus (AcMNPV). Esta proteína es el principal contaminante. Aun al concentrar el sobrenadante por colchón de sacarosa, la pureza es tan sólo del 20%, por lo que se buscaron métodos alternativos de purificación.

#### **8.2.5.1 Purificación por intercambio aniónico**

Mena (2007) reportó la remoción de baculovirus y ácidos nucleicos por intercambio aniónico con la resina Q sepharosa Fast Flow, en donde el pH del amortiguador de carga fue de 6.16, punto isoeléctrico teórico de su proteína de interés, VP6, por lo que la proteína VP6 no interacciona con la resina mientras que GP64, que recubre el baculovirus, y los ácidos nucleicos quedan retenidos en la columna. Esto se extrapoló para la purificación de la proteína PPV ZIKV, en donde la proteína E ( $PI$  teórico 6.5) se espera esté en la superficie como ocurre en el virión. El amortiguador de equilibrio se utilizó al mismo pH de forma que la proteína ZIKV M-E (minus TM) JEV E (TM) no interaccione con la resina.

Se procedió a realizar la purificación por intercambio aniónico en modo *flowthrough* del sobrenadante de las células *Sf9* y después se determinó el grado de pureza por densitometría del gel de poliacrilamida teñido con plata (Figura 32).

El carril 3 es el flowthrough del intercambio aniónico donde se esperaba la obtención de la proteína de interés sin contaminantes, pero se observó que coeluyeron la proteína E (50kDa) y GP64 (58 kDa), mientras los contaminantes por debajo de 50 kDa se eliminaron. En el carril 4, correspondiente a la elución, también se observa la coelución de ambas proteínas, llegando a un 50% de pureza, sin embargo, se tiene aún la glicoproteína GP64. Esto difiere de lo reportado por Mena y colaboradores (Mena *et al.*, 2007), muy probablemente porque la PPV purificada no está envuelta, en nuestro caso es una PPV envuelta. Ahora bien, el baculovirus también es un virus envuelto que adquiere su membrana celular del huésped (Rohrmann 2019; Krol *et al.*, 2019) por lo que existe la posibilidad de que tanto las PPV ZIKV como los baculovirus contengan tanto la proteína GP64 como la proteína E.



**Figura 32.** Análisis por SDS-PAGE revelado con tinción de plata de las PPV ZIKV purificadas por intercambio aniónico. Carril 1: Marcador dual color; Carril 1: Sobrenadante de *Sf9* infectadas con Bac-PPV ZIKV, MDI 1; Carril 2: Flowthrough; Carril 3: Elución.

### 8.2.5.2 Purificación por afinidad

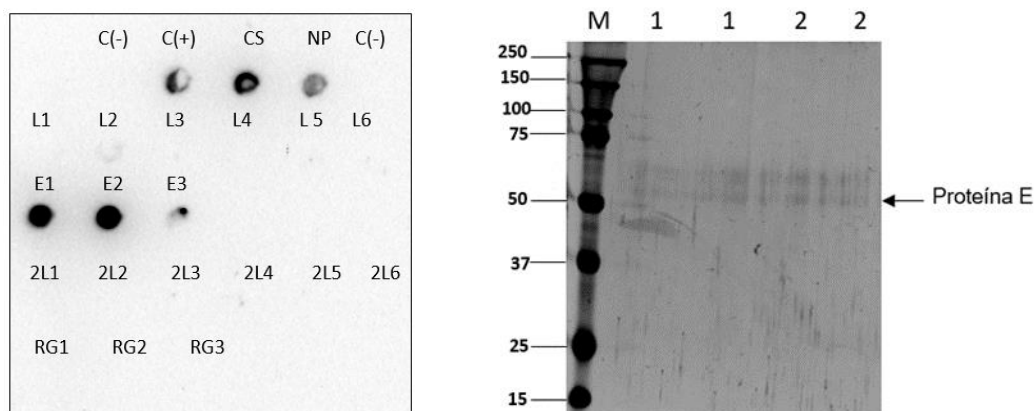
Las PPV de ZIKV concentradas por colchón de sacarosa fueron purificadas con la resina de afinidad de Sepharosa 4B AcM EDE1 C8, cuyo epítipo es la interfaz del dímero de la proteína E (Barba *et al.*, 2016). La resina se generó al unir covalentemente el anticuerpo EDE1 C8 a la resina activada con bromuro de cianógeno (CNBr) como se describe en metodología. El protocolo de purificación se resume en la tabla 11.



Tabla 11. Purificación de PPV con la resina Sepharosa 4B AcM EDE1 C8					
Paso	Solución	VC	Fracciones colectadas		
			Nombre de la muestra	Volumen colectado	
1	Equilibrio	PBS pH 7.4	15 VC		
2	Muestra	PBS pH 7.4	OVN 4°C	NP	800 µg proteína
3	Lavados	PBS pH 7.4	12 VC	L	2 mL c/u
4	Elución	Glicina 0.1M pH 2.75	4.5 VC	E	1.5 mL c/u
5	Lavado	PBS pH 7.4	12 VC	2L	2 mL c/u
6	Regeneración	NaCl 1M	6 VC	RG	2 mL c/u

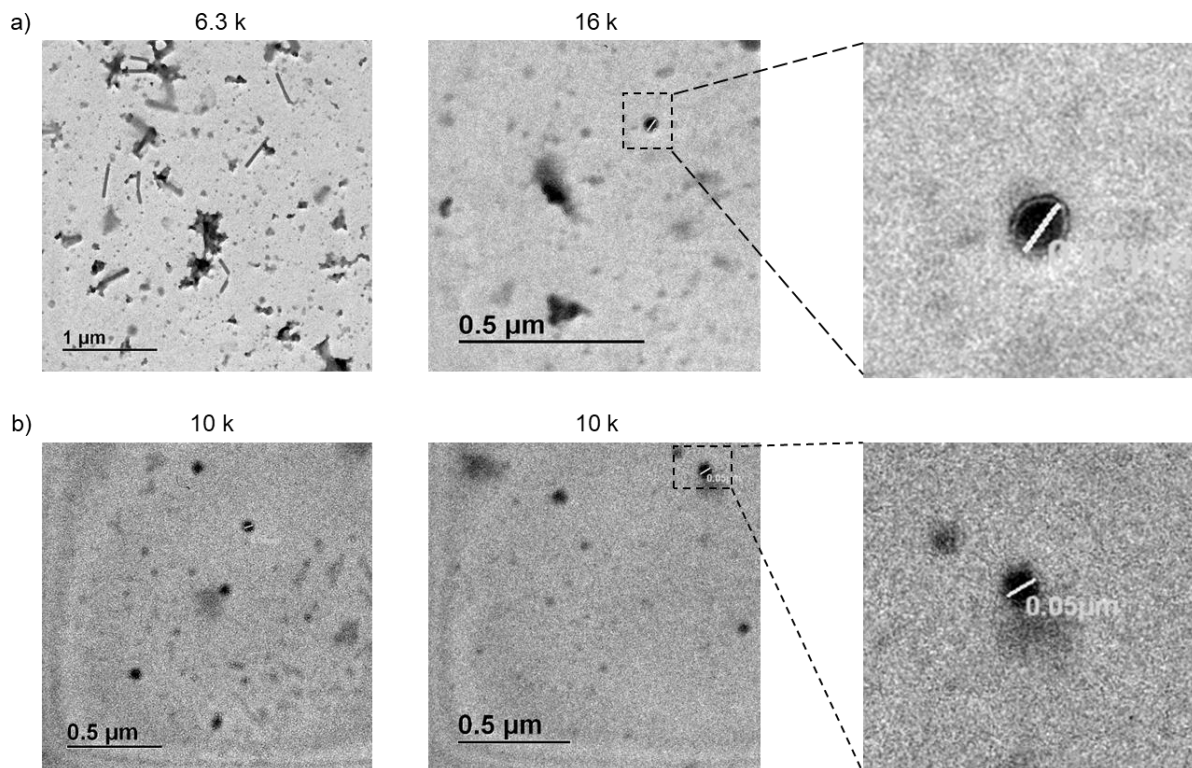
NP-No pegado

Posteriormente las fracciones fueron evaluadas por Dot blot anti-EDE ZIKV (Figura 33 a), donde muy probablemente se saturó la resina debido a que se observa señal en el no pegado (NP). En los pasos del primer lavado (L), segundo lavado (2L) y regeneración (RG) no se observa señal. Al eluir con cambio de pH, se observa señal en las dos primeras fracciones, por ende, las PPV fueron retenidas por la resina. Con la finalidad de analizar el porcentaje de pureza de las fracciones E1 y E2, las muestras fueron concentradas y separadas en un gel SDS PAGE para su posterior su tinción con plata (Figura 33 b). La pureza mejoró considerablemente de 20 al 50% para ambas fracciones.



**Figura 33.** Análisis por Dot blot anti-EDE ZIKV y SDS-PAGE revelado con tinción de plata de las PPV purificadas por afinidad. a) Dot blot. CS: Sobrenadante concentrado por ultracentrifugación; NP: No pegado; L: lavados; E: Elución; RG: Regeneración; C (+): Control positivo; C (-): Control negativo. 50 µL de muestra por pozo. b) SDS-PAGE de las fracciones de elución. M: Marcador dual color (1µL), Carril 1: Fracción de elución 1 concentrada, carril duplicado; Carril 2: Fracción de elución 2 concentrada, carril duplicado.

Luego, las muestra del sobrenadante concentrado por ultracentrifugación y la fracción E2 fueron teñidas negativamente y analizadas por microscopia electrónica de transmisión (Figura 34). En las primeras muestras solo fue posible observar una PPV de Zika debido a que contenía grandes cantidades de baculovirus, estructura en forma de baston o varilla mientras la muestra purificada se encontraba libre de ellos.



**Figura 34.** Análisis por tinción negativa en el microscopio de transmisión electrónica a diferentes magnificaciones (k). a) Sobrenadante concentrado por colchón de sacarosa. b) Sobrenadante concentrado por colchón de sacarosa y purificado con la resina de afinidad AcM C8 EDE, fracción E2.

Se observaron PPV esféricas, con envoltura y con un diámetro promedio de  $50 \pm 20$  nm de diámetro. El diámetro de las PPV descritas en este trabajo es más uniforme que el diámetro ( $50 \pm 30$  nm) de las PPV de Zika producidas en el mismo sistema por Dai *et al.* (2018)

## 8.3 PRODUCCIÓN DE PPV ZIKV EN CÉLULAS DE MAMÍFERO

### 8.3.1 Generación de una línea estable por el método tradicional

La expresión estable de un gen involucra la transfección de las células con uno o más vectores de expresión seguida de una fase de selección durante una a tres semanas. Las células recombinantes que sobreviven a la selección pueden ser mantenidas como un grupo de células para la producción de proteínas o puede procederse a la clonación de células individuales para generar líneas estables (Hacker *et al.*, 2016), en nuestro caso nos interesó generar un grupo de células estables productoras de la proteína ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM).

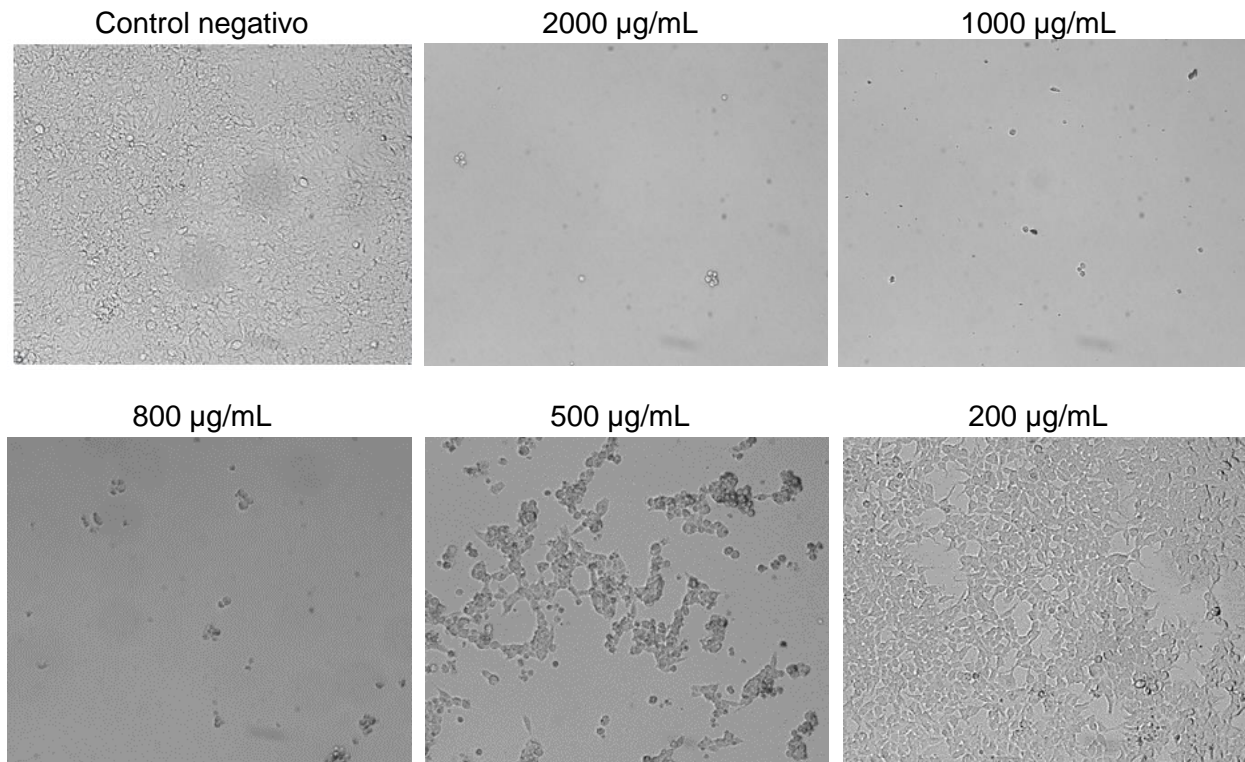
#### 8.3.1.1 Determinación de la dosis mínima de antibiótico para las células HEK-293

Para la generación de una línea estable que exprese la proteína de interés es necesario en primera instancia determinar la concentración mínima de neomicina requerida para matar la línea huésped sin transfectar. Por esta razón la línea HEK-293 a una confluencia de 25% se incubó con diferentes concentraciones de antibiótico. Las células fueron monitoreadas durante dos semanas (Figura 35) y cada tercer día se cambiaba el medio con neomicina, aminoglucósido que se une a los componentes del ribosoma e interfiere su función bloqueando la elongación de la síntesis de proteínas (Lanza *et al.*, 2013).

En el noveno día, el control negativo estaba a una confluencia del 100%. A la concentración de 2000, 1000 y 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de neomicina, las células estaban muertas, mientras a 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  la confluencia era del 20%, y a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  la monocapa estaba al 90% de confluencia. En el día 15, las células con antibiótico se encontraban al mismo porcentaje de confluencia. Por tanto, la dosis mínima de antibiótico para las HEK-293 corresponde a 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , esta es una dosis intermedia con respecto a las normalmente utilizadas de 400 a 1, 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , dependiendo de la línea celular (manual de Invitrogen, 2010).

### 8.3.1.2 Transfección y selección de la línea estable

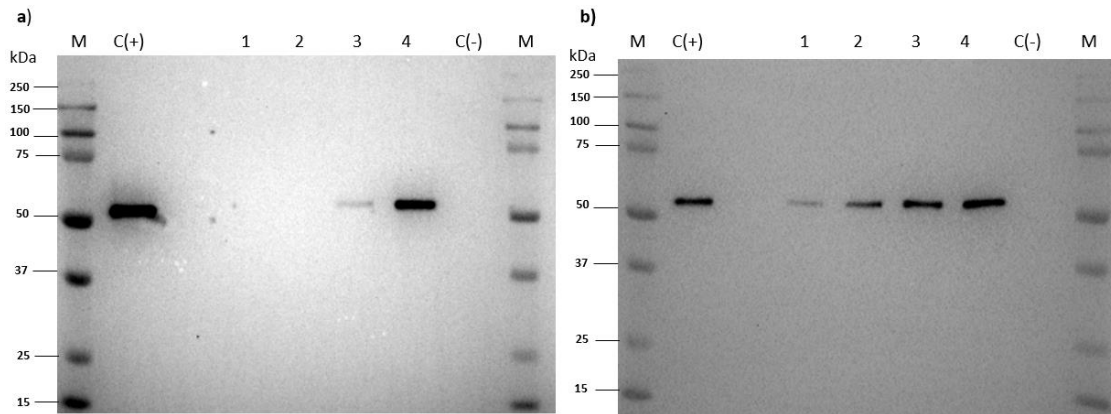
Antes de la selección y generación de la línea estable, se verificó la expresión de la proteína E. Para ello se transfectaron las células HEK-293 en una caja de 6 pozos y cada 24 h se recolectó el pellet y sobrenadante para determinar la expresión de la proteína E por Western blot (Figura 34).



**Figura 35.** Determinación de la dosis mínima de neomicina para las células HEK-293. Amplificación 10x en el noveno día de cultivo con antibiótico.

Se observó producción de la proteína E y por ende de la proteína M en el pellet y en el sobrenadante de las células HEK-293 transfectadas. En el pellet se observa expresión desde las 24 h con una máxima expresión a las 96 h postransfección. En las primeras horas, 24 y 48 h, no se observó producción de la proteína en el sobrenadante del medio de cultivo, muy probablemente por la baja cantidad de proteína, mientras que a las 96 h se ve claramente su secreción. Debido a esto, podemos decir que la secuencia señal y el cambio del dominio transmembrana de ZIKV resultaron en la secreción de la proteína,

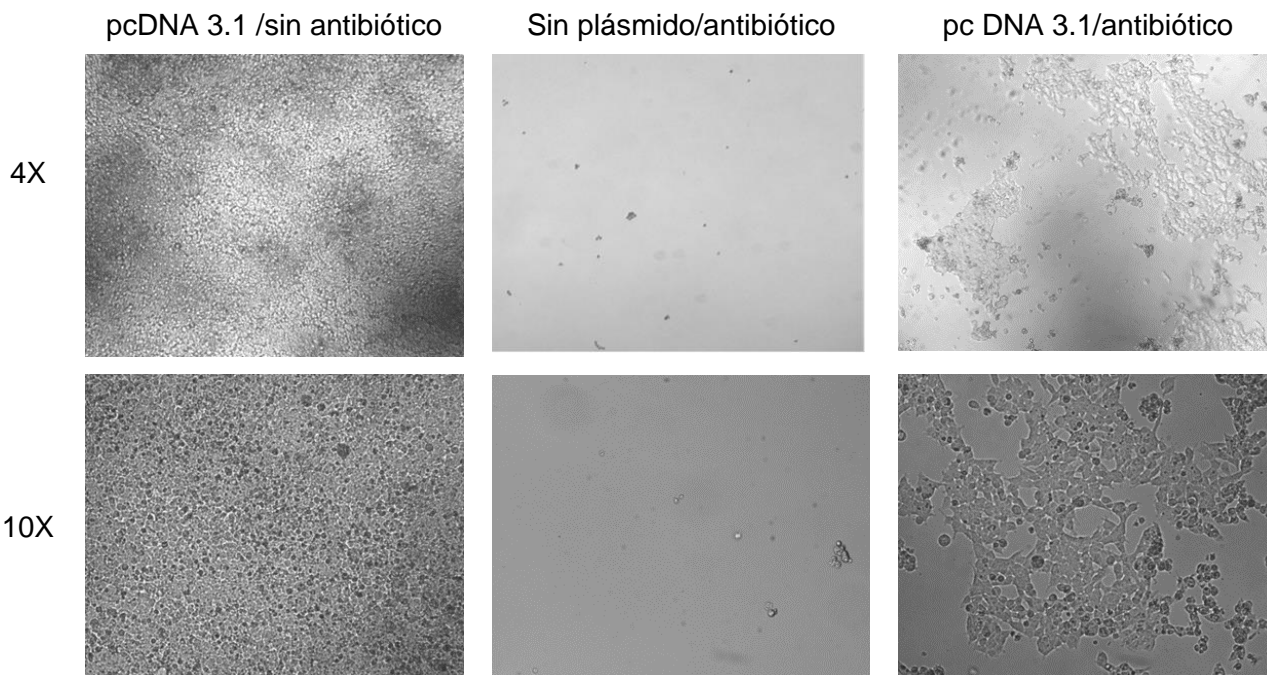
como lo reporta Yamaii *et al.* (2016) para células de insecto y Davis *et al.* (2000, 2001) y Chan *et al.* (2002) en células CHO y COS-1.



**Figura 36.** Western blot anti-E ZIKV de la transfección de células HEK-293 con el plásmido pcDNA 3.1-ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM). a) Muestras de sobrenadante: Carril 1 al 4: 24, 48, 72, 96 h post transfección respectivamente; 300  $\mu$ L de sobrenadante por pozo. b) Muestras de pellet: 24, 48, 72, 96 h post-transfección respectivamente. M: marcador; C (+) Control positivo; C (-): Control negativo.

Posteriormente, las células HEK-293 se transfectaron con el plásmido pcDNA 3.1 (+) para la generación de la línea estable. A las 24 h post transfección se colocó 800  $\mu$ g/mL de neomicina, dosis mínima de antibiótico para las células HEK-293 al noveno día, con cambio de medio y antibiótico cada tercer día. El control de la expresión de la proteína M-E es la cinética mostrada anteriormente. La confluencia al noveno día de las células HEK-293 sin transfectar con antibiótico era nula tal y como se había determinado previamente, lo contrario se observó para las células con pcDNA 3.1 (+) sin antibiótico mientras la confluencia de las células HEK-293 con pcDNA 3.1 (+) / antibiótico era del 10%; al día quince de selección las células tenían una confluencia de 40% (Figura 37).

Se esperaba que las células HEK-293 seleccionadas con neomicina hayan integrado en su genoma el gen de resistencia al antibiótico y el transgén ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM). La integración del transgén se realiza por un extremo no homólogo que se une al genoma de la célula huésped en la posición de una ruptura cromosómica aleatoria, a este proceso se le denomina unión de extremos no homólogos (*non-homologous DNA end-joining*, NHEJ) (Büssow *et al.*, 2015; Hacker *et al.*, 2016).

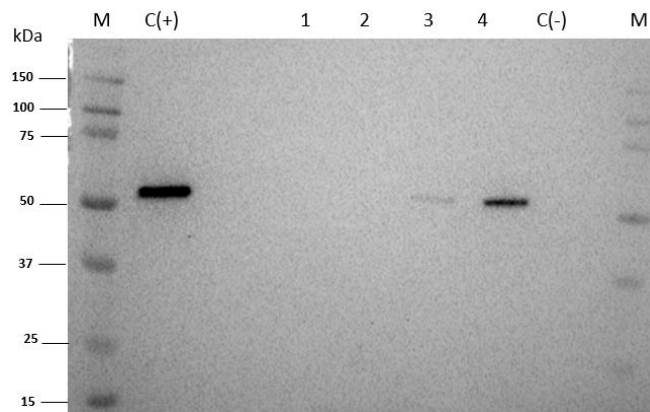


**Figura 37.** Selección con neomicina de las células HEK-293 transfectadas con pcDNA 3.1 (+) ZIKV M-E (minus TM), JEV (TM). Día 15 de las células HEK-293 con 10% SFB a 4X y 10x de aumento.

El siguiente paso fue verificar la expresión del transgén por Western blot. Con la finalidad de tener más volumen de sobrenadante, las células se amplificaron a formato T75, aún con presión de selección. Después el sobrenadante fue concentrado por colchón de sacarosa al 20%. Se evaluó el pellet celular y diferentes volúmenes del sobrenadante: 30  $\mu$ l, 200 $\mu$ L, y 15 mL concentrados. En el pellet y en el carril 6 de la figura 38 se puede ver una banda apenas detectable correspondiente a la proteína E a partir de los 15 mL de sobrenadante concentrado.

Fue posible la selección con antibiótico de células HEK-293 productoras de ZIKV M-E (minus TM), TM JEV, las cuales tienen una muy baja producción (apenas detectable por Western blot). Anteriormente, se han producido proteínas citosólicas con líneas de mamíferos estables generadas al transfectar con el plásmido pcDNA 3.1 y seleccionadas con zeocina o puromicina. Sin embargo, el rendimiento fue muy bajo comparado con otros sistemas de expresión, aún al realizar la selección clonal (Yang *et al.*, 2013; Kjaer *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2014). Esto se debe a que muy pocas células integran el vector en

regiones activas transcripcionalmente e incluso se ha visto que la expresión génica se silencia a largo plazo (Büssow *et al.*, 2015).



**Figura 38.** Western blot anti-E ZIKV del sobrenadante de las células HEK-293 seleccionadas con neomicina. Carril 1: Sobrenadante directo 30  $\mu$ L; Carril 2: Sobrenadante 200  $\mu$ L concentrados en savant; Carril 3: Sobrenadante concentrado por ultracentrifugación (11 mL); Carril 4: Pellet; M: Marcador; C (+): Control positivo; C (-): Control negativo.

La neomicina ha sido comparada con otros marcadores de selección como zeocina, higromicina y puromicina en la generación de líneas estables al transfectar con plásmidos. La selección con neomicina independientemente del tipo celular resultó con el menor porcentaje de células que expresan el transgén con tan solo el 1.07% mientras que la zeocina fue el mejor marcador de selección ya que 80% de la población expresan el transgén. A pesar de ello se observó que al retirar la neomicina por un mes, aumentó el porcentaje de células que expresaban la proteína al 2.34% de la población (Lanza *et al.*, 2013), lo cual puede deberse a las alteraciones epigenéticas y transcripcionales causadas por la neomicina, como se explica a continuación.

Como se mencionó anteriormente, las células transfectadas adquieren el transgén y el gen de resistencia a neomicina denominado *aph*. APH es una cinasa que inactiva al aminoglucósido y genera una molécula llamada ADAADi (“active DNA-dependent ATPase A domain”), que es un potente inhibidor de las proteínas SWI2/SNF2. Estas proteínas movilizan los nucleosomas y remodelan la cromatina, por ende, al estar inactivos se inhibe la translocación de los nucleosomas, generando alteraciones

epigenéticas que pueden afectar la expresión del transgén. Además, se ha evidenciado que, en las primeras horas de selección, la alteración epigenética puede ser revertida al remover el antibiótico; sin embargo, si las células se mantienen con antibiótico incluso durante 24 h, las alteraciones no se revierten a menos que se mantengan por varios pases sin antibiótico (Dutta *et al.*, 2012). Por tanto, el marcador de selección elegido, así como el método no fueron favorables para la generación de la línea estable, ya que la eficiencia de integración en el genoma es muy baja, además pocas células integran el transgén en regiones transcripcionalmente activas (Büssow *et al.*, 2015); esto resultó en la generación de una línea celular con bajos rendimientos de producción de proteína recombinante.

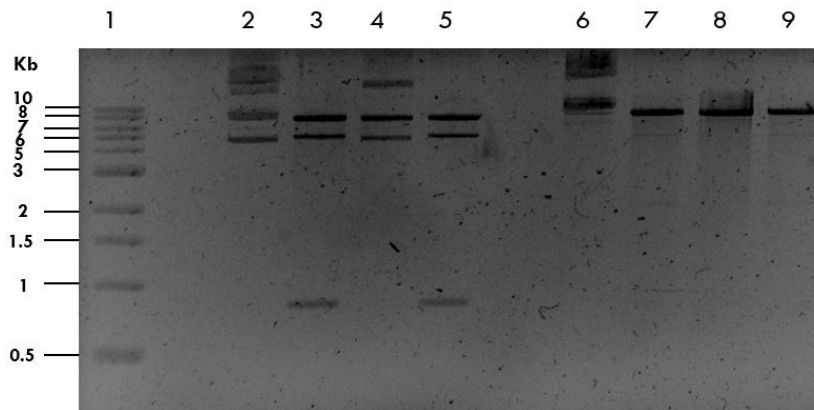
### **8.3.2 Generación de la línea estable con vector lentiviral**

Una alternativa para aumentar la producción de PPV de ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM) fue el uso de lentivirus, replicones defectuosos utilizados para entregar genes a células mediante transducción, capaces de integrar el transgén en áreas transcripcionalmente activas, lo que se refleja en líneas celulares altamente productoras de proteínas recombinantes (Merten *et al.*, 2016; Hacker *et al.*, 2015; Prieto *et al.*, 2011).

#### **8.3.2.1 Generación del vector de transferencia**

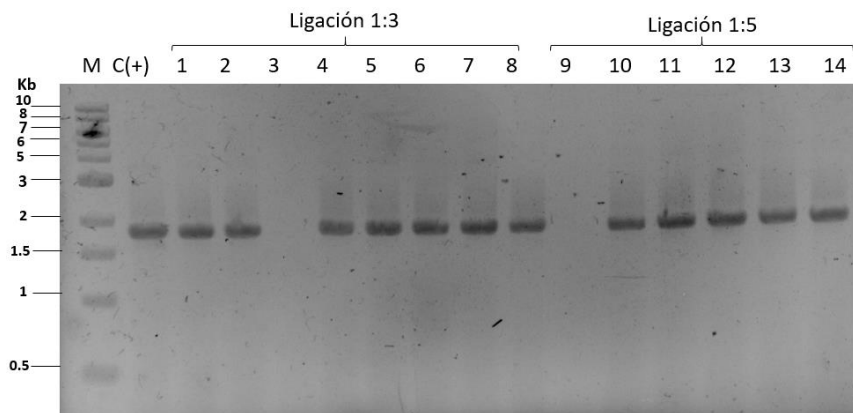
El laboratorio del Dr. Claudio Prieto amablemente nos donó los plásmidos pLV PLK EF-1 $\alpha$  y pLV PLK, en donde el transgén se clona bajo el promotor de EF1 $\alpha$  humano y CMV, respectivamente. En primera instancia, los plásmidos fueron evaluados con las enzimas de restricción a utilizar, BamHI y NheI (Figura 39). En los carriles 2-5 está el plásmido pLV PLK cortado con BamHI (carril 3), con NheI (carril 4) y con ambas enzimas (carril 5); se esperaba una banda de 7.7kb, sin embargo, BamHI liberó un fragmento de casi 1kb. Por otra parte, el plásmido pLV PLK EF-1 $\alpha$  (carril 6-9) también se cortó con las enzimas BamHI y NheI, en este caso se observa una sola banda correspondiente al plásmido linearizado de 8.5kb por lo que se decidió trabajar con el plásmido pLV PLK EF-1 $\alpha$ . El promotor EF-1  $\alpha$  permite lograr una expresión robusta, constitutiva y a largo plazo del gen de interés mientras el promotor de CMV algunas veces es silenciado por metilación lo que disminuye la expresión del transgén (Kim *et al.* 1990; Tokushige *et al.*, 1996; Kong *et al.*, 2009).





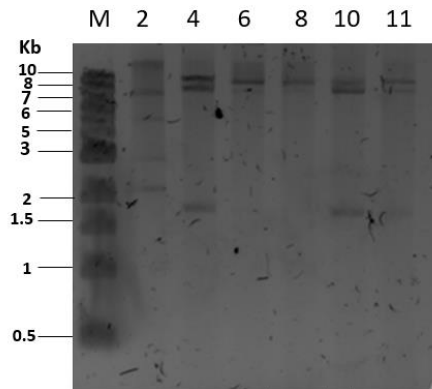
**Figura 39.** Análisis del plásmido pLV PLK EF-1 $\alpha$  y pLV PLK por enzimas de restricción en gel de agarosa al 1%. Carril 1: Marcador de 1kb; Carril 2: pLV PLK; Carril 3: pLV PLK BamHI; Carril 4: pLV PLK NheI; Carril 5: pLV PLK BamHI/ NheI; Carril 6: pLV-HF1 $\alpha$ ; Carril 7: pLV-HF1 $\alpha$  BamHI; Carril 8: pLV-HF1 NheI; Carril 9.- pLV-HF1 BamHI/ NheI

Posteriormente, el fragmento ss, ZIKV M-E (minus), JEV E (TM) se amplificó y clonó en el vector pLV PLK EF-1 $\alpha$  entre los sitios NheI/BamHI. Las bacterias DH5 $\alpha$  se transformaron con la mezcla de ligación 1:3 y 1:5 (vector: inserto) y se evaluó por PCR de colonia la presencia del inserto. El inserto de aproximadamente 1800 pb estuvo en ambas condiciones de ligación (Figura 40).



**Figura 40.** Análisis por PCR de colonia de la reacción de ligación de pLV PLK EF-1 $\alpha$  y el inserto en gel de agarosa al 1%. Carril 1: Marcador de peso molecular 10kb; C (+): Control positivo; Los números corresponden a la colonia evaluada. 1:3, 1:5 indica la mezcla de ligación.

Posteriormente se extrajo el DNA plasmídico de ciertas colonias y se verificó por corte con las enzimas de restricción BamHI/NheI la presencia del fragmento de 1.8kb correspondiente al inserto ss, ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM). La colonia 4 (ligación 1: 3) y colonia 10 (ligación 1:5) liberaron el fragmento del peso esperado (Figura 41). Después se verificó la secuencia del inserto en la colonia 2, la cual presentó un 100% de identidad con la secuencia esperada.



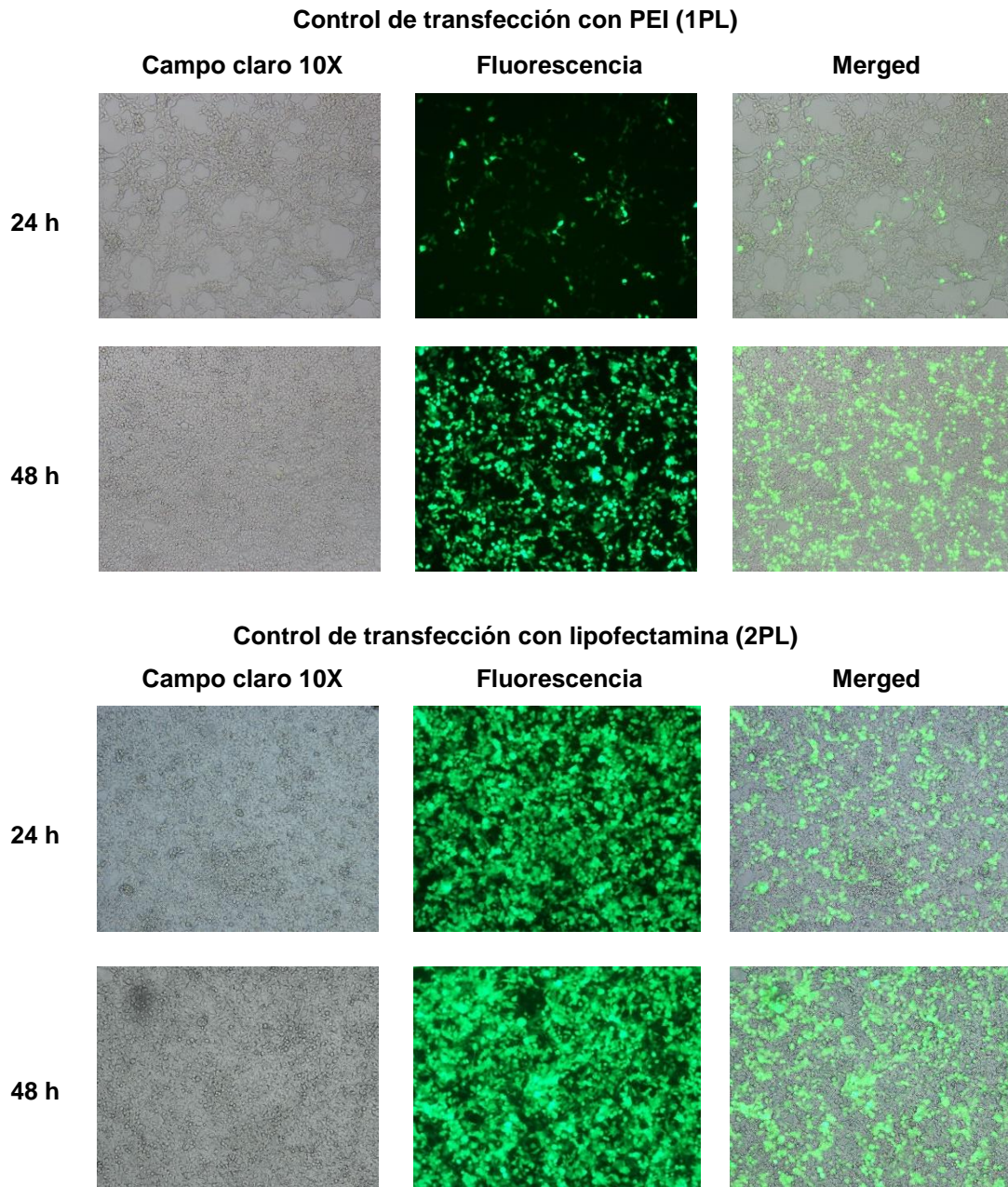
**Figura 41.** Análisis por enzimas de restricción del vector pLV PLK EF-1 $\alpha$  en gel de agarosa al 1%. Carril 1: Marcador de peso molecular de 1kb; Carriles restantes: corresponden al número de la colonia evaluada. La numeración de los carriles corresponde a la colonia evaluada.

### 8.3.2.2 Ensamblado de lentivirus de tercera generación

Las células HEK-293 T/17 en adherencia fueron transfectadas de forma transitoria con los plásmidos: pRSV-REV, pMD.G, pMDLg/pRRe (Naldini *et al.*, 1996; Dull *et al.*, 1998) y con el vector de transferencia pLV-HF1 $\alpha$ -GFP (control positivo) o pLV-HF1 $\alpha$ -ss, ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM) utilizando polietilamina (PEI) y lipofectamina (Figura 42).

Las partículas lentivirales generadas al transfectar con PEI corresponden al primer ensamblaje (1PL) mientras las generadas con lipofectamina conciernen al segundo ensamblaje (2 PL). La proporción de células fluorescentes fue menor al utilizar PEI, posiblemente porque el reactivo no estaba en condiciones óptimas de almacenamiento. El PEI tiene mayor ventaja eficiencia/costo sobre la lipofectamina (Yang *et al.*, 2016), sin embargo para una buena eficiencia hay que tomar en cuenta los siguientes factores: la concentración de DNA, relación PEI/DNA de acuerdo a la proporción nitrógeno-fósforo

$N/P = 7.75 * \frac{PEI (\mu g)}{DNA (\mu g)}$ , evitar su descongelación, y almacenarlo a 4 °C, máximo tres meses en solución (Yang *et al.*, 2017; Gutiérrez *et al.*, 2018).



**Figura 42.** Control de transfección con PEI y lipofectamina de las células HEK-293T/17. Los plásmidos utilizados fueron: pRSV-REV, pMD.G, pMDLg/pRRe y pLV-HF1 $\alpha$ -GFP.

Los lentivirus de GFP y ZIKV fueron recuperados del sobrenadante de cultivo a las 48 h post transfección. La mitad del sobrenadante se concentró 1000 veces con respecto al volumen inicial. Después los lentivirus concentrados y no concentrados fueron almacenados a -70°C hasta su uso.

### 8.3.2.3 Cuantificación de partículas lentivirales

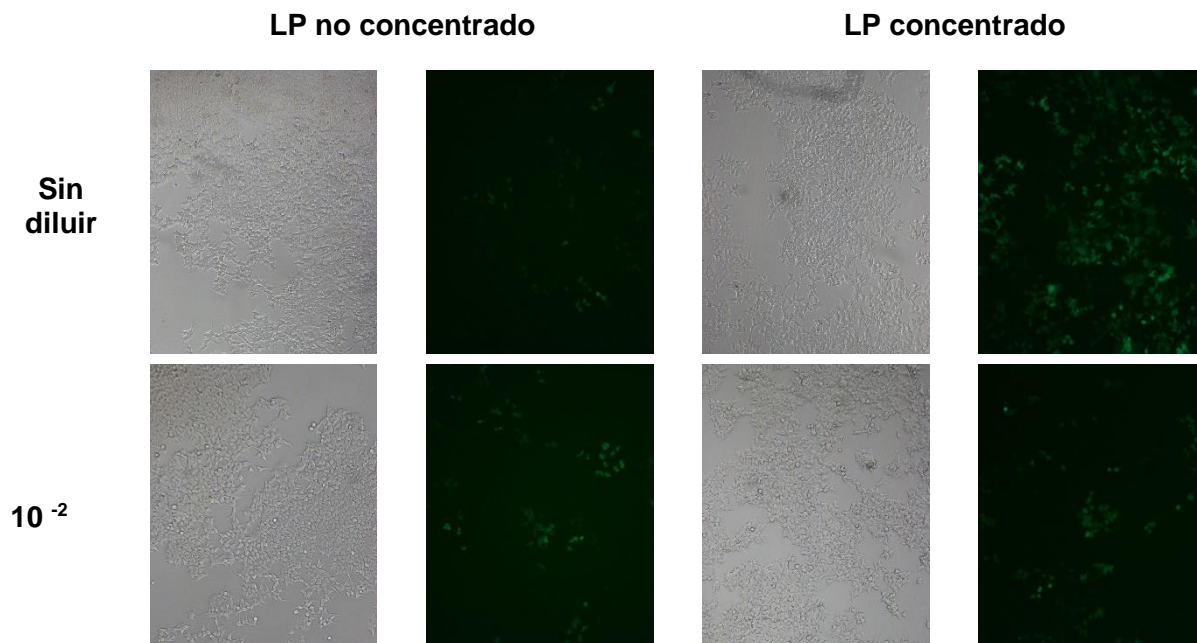
La titulación de partículas lentivirales se realizó por ELISA con “Cell Biolab’s Quick Titer Lentivirus Titer Kit”, a través de la cuantificación de la proteína p24 de HIV-1 asociada al core del lentivirus, en donde la proteína p24 libre se descarta de la cuantificación.

A partir de la curva estándar, se calculó la concentración de p24 (ng/mL) y con ello el título de las partículas lentivirales físicas, como se describe en metodología, expresándolo en partículas lentivirales por mililitro (PL/mL). El título de las PL del control positivo sin concentrar fueron 1.36E+07 PL/mL, el de las PL de ZIKV se encuentran en el mismo rango (Tabla 12). Generalmente se obtienen títulos de  $10^8$  (Yang *et al.*, 2017; Fontana, 2015) por lo que es un título bajo. El título de las PL concentradas 100 veces del control positivo fue 2.12E+08, en el mismo orden se encuentran las PL ZIKV concentradas. Se esperaban títulos de  $10^{10}$ , lo que indica que la ultra centrifugación no fue efectiva. Este valor no es un título infeccioso normalmente expresado como unidades transductoras por mililitro (UT/mL), sin embargo, nos permite hacer una estimación al suponer que 1 UT es aproximadamente igual a 100 a 1000 PL, por lo que  $10^6$  UT/mL equivale a  $10^{8-9}$  PL/mL. Dado que el intervalo es amplio, fue necesario comprobar las UT por citometría de flujo.

<b>Tabla 12. Cuantificación de partículas lentivirales por ELISA</b>					
Muestras	p24 (ng/mL)	Concentración p24 (ng/mL)	LP (LP/mL)	UT (UT/mL)	
LV-GFP	4.34	1.09	1.36E+07	1.36E+05	1.36E+04
LV-GFP concentrada	3.39	16.95	2.12E+08	2.12E+06	2.12E+05
LV-ZIKV	10.16	2.54	3.18E+07	3.18E+05	3.18E+04
LV- ZIKV concentrado	18.58	74.32	9.29E+08	9.29E+06	9.29E+05

Para determinar las UT de PL GFP concentrado y sin concentrar se plaquearon células HEK-293 T/17 en una placa de 96 pozos considerando 3 columnas por muestra. Al día

siguiente, se realizó la transducción con diluciones seriadas de las muestras, y las células fueron incubadas por 96 h. En la figura 43 se muestran las células HEK 293T/17 transducidas con PL GFP sin diluir (primera fila) y diluida  $10^{-2}$  (segunda fila) al término de las 96 h, donde se observa un mayor número de células transducidas con el PL GFP concentrado en comparación con el sobrenadante sin concentrar. Posteriormente, las células se analizaron por citometría de flujo. En el cálculo de la titulación, únicamente se consideraron aquellas diluciones en las células presentan un porcentaje de fluorescencia del 3 al 20% (células GFP<sup>+</sup>) debido a que por debajo del 1%, el citómetro no tiene precisión para determinar el número de células GFP<sup>+</sup>. Por otra parte, cuando el porcentaje es mayor al 30%, la probabilidad de que una célula GFP<sup>+</sup> se transduzca dos veces aumenta significativamente. Una vez determinada la dilución adecuada, se procede a determinar el título, como se describe en metodología (Lesh *et al.*, 2010).



**Figura 43.** Células HEK-293 T/17 transducidas con LP GFP durante 96 h. Primera fila: LP- GFP sin diluir, segunda fila: dilución  $10^{-2}$ . Imágenes con objetivo 10x.

El título de las PL GFP no concentradas fue de  $2.54 \text{ E}+05 \text{ UT/mL}$ ; en el mismo se orden están los PL concentrados ( $3.45 \text{ E}+05 \text{ UT/mL}$ ), lo cual es muy semejante a las UT/mL estimadas a partir de las PL/mL,  $1.36\text{E}+05$  y  $2.12\text{E}+05$ , respectivamente. El título de PL ZIKV no concentradas es de  $3.18 \text{ E}+5$  y  $9.29\text{E}+6$  para PL ZIKV concentradas, los cuales

son títulos bajos. Los títulos sin concentrar usualmente oscilaban entre  $10^6$  a  $10^8$  UT/mL y dos órdenes mayores de magnitud cuando son concentrados (Sutton *et al.*, 2002; Fontana, 2015; Wilhelm *et al.*, 2016). Sin embargo, últimamente se han obtenido títulos menores en el laboratorio del Dr. Prieto, sin encontrar aún una causa aparente.

El título viral depende principalmente de un ensamblaje correcto, que a su vez depende de la transfección y del tamaño de la construcción lentiviral entre el 5' y 3' LTR. La sección de la construcción lentiviral debe ser aproximadamente entre 9kb o menos, lo que corresponde al tamaño del genoma del VIH nativo, superior a 9kb disminuye el título de las partículas lentivirales (Kahlig *et al.*, 2010). En nuestro caso, el tamaño de la construcción lentiviral es menor a 9kb, sin embargo, la transfección no fue eficiente, lo cual se atribuye al prolongado almacenamiento del PEI. Debido a ello, se realizó el segundo ensamblaje que no se tuvo la oportunidad de titular, pero se espera que las LP tengan un mayor título, ya que la transfección fue eficiente. Aún así, se continuó con la transducción de las células HEK-293T/17.

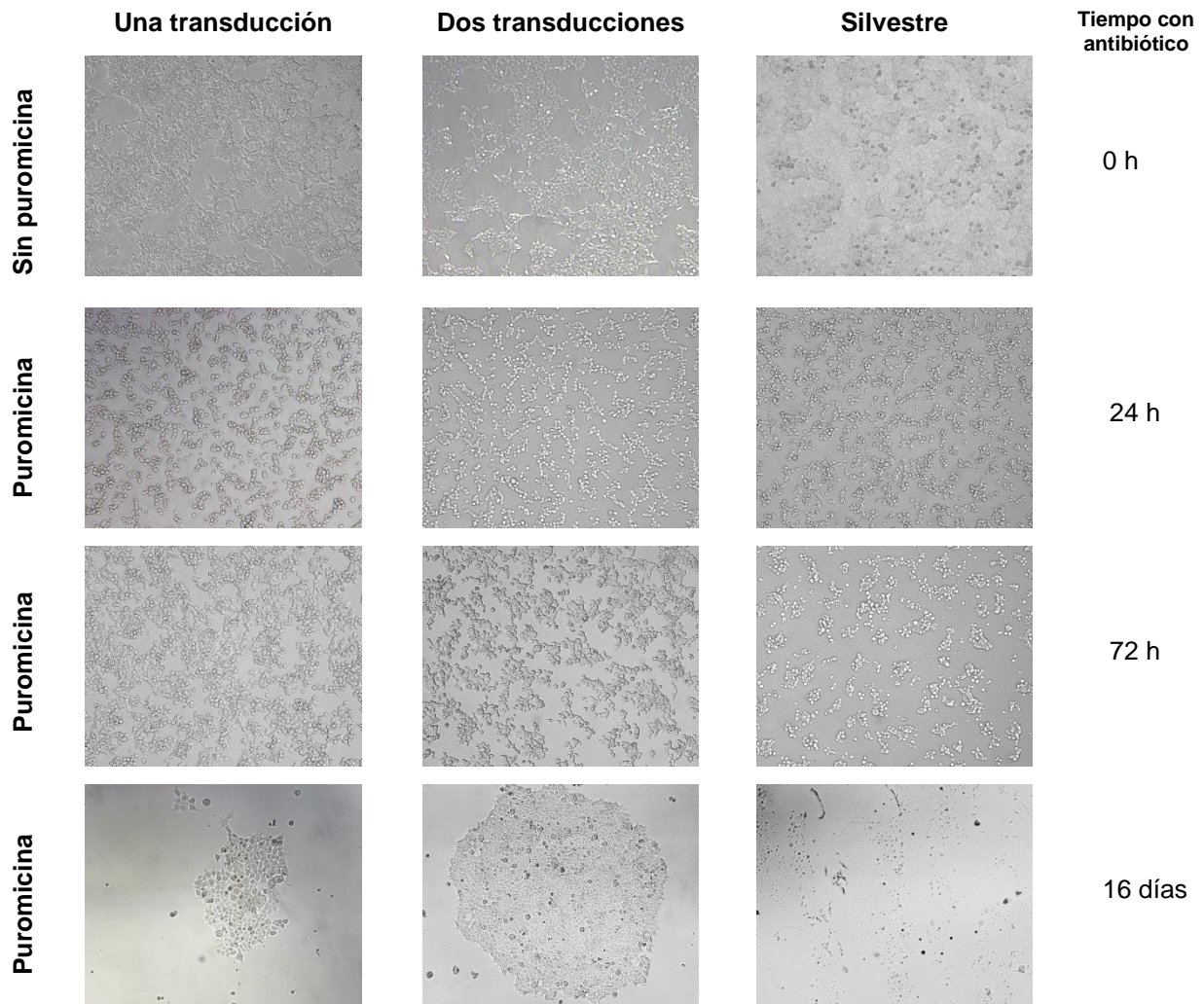
#### **8.3.2.4 Transducción con PL y selección de células HEK-293 T/17**

En una placa de 24 pozos, se sembraron células HEK-293 T/17 a una concentración de 300 000 cel/mL (dos pozos) y se realizó la transducción por 72 h con 1 mL de PL de ZIKV sin concentrar. Después, a uno de los pozos se le hizo una segunda adición de PL. Cabe mencionar que las transducciones se realizaron sin conocer el título de las PL; ahora se sabe que cada transducción corresponde a una MDI de 1 UT/célula, la cual es muy baja. Se han reportado MDI desde 20 PL/cel para la transducción de HEK-292T/17 con PL que contiene el transgén de la glicoproteína de rabia (Fontana 2015; Fontana *et al.*, 2014) hasta MDI de 2450 para PL con el transgén de GFP (Prieto *et al.*, 2011), aunque usualmente oscilan entre 100 a 500 (Gaillet *et al.*, 2010). En si, el objetivo es usar una MDI que maximice la expresión del transgén, preservando la viabilidad celular; una MDI demasiado baja puede dar lugar a células diana que expresen muy poco el transgén de interés mientras que una MDI alta puede dar lugar a células que muestren signos de estrés (Mendenhall *et al.*, 2012).

Una vez que las células alcanzaron una confluencia del 80%, se sembraron a 300, 000 cel/mL y se seleccionaron para obtener líneas celulares recombinantes estables. Hay dos protocolos a) Selección de un sólo paso: las células se incuban con 1, 5, 10, 50, 100, 150, 200 µg/mL del agente de selección en diferentes placas y b) Selección gradual: las células se incuban con 1 a 250 µg/mL del agente de selección el cual se cambia progresivamente cada 5 días. Con este último método se reporta el mantenimiento de las células HEK-293T/17 hasta con 200 µg/mL del agente de selección y con mayores niveles de expresión de proteína recombinante de hasta 2 a 6 veces dependiendo de la concentración del antibiótico. Por el contrario, los cultivos de células con selección en un sólo paso son resistentes hasta 50 µg/mL con niveles más bajos de expresión (Prieto *et al.*, 2011). Debido a ello se utilizó el método de selección gradual, iniciando con una concentración de 1 µg/mL de puromicina (Figura 44).

Las células transducidas y las silvestres con antibiótico presentaron gránulos y formaron agregados después de 24 h de selección. A las 96 h, las células silvestres estaban muertas y las células transducidas restantes se veían granulares y no adheridas totalmente a la placa. En el día 16, se observaban focos de células resistentes al antibiótico; se formaron cuatro focos en los pozos de la primera transducción y diez para la segunda transducción. Una vez que las células tuvieron una confluencia mayor del 60% se realizó la tercera transducción (1 UT/cel) y a la par se incrementó gradualmente la dosis de antibiótico de las células transducidas previamente.

El tiempo para la obtención de células transducidas con LP resistentes a antibiótico no es el esperado de acuerdo con la experiencia del laboratorio del Dr. Prieto, por lo que se volvió a realizar la transducción de las células HEK 293T/17 con las LP del segundo ensamblaje de ZIKV (2LP ZIKV), utilizando como control LP GFP en la transducción y en la selección. A las 48 h post-transducción se observó la expresión de la proteína GFP, esperando también la expresión de ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM). Al término de las 72 h la placa estaba confluyente y más del 50% de las células expresaban la proteína GFP (Figura 45).

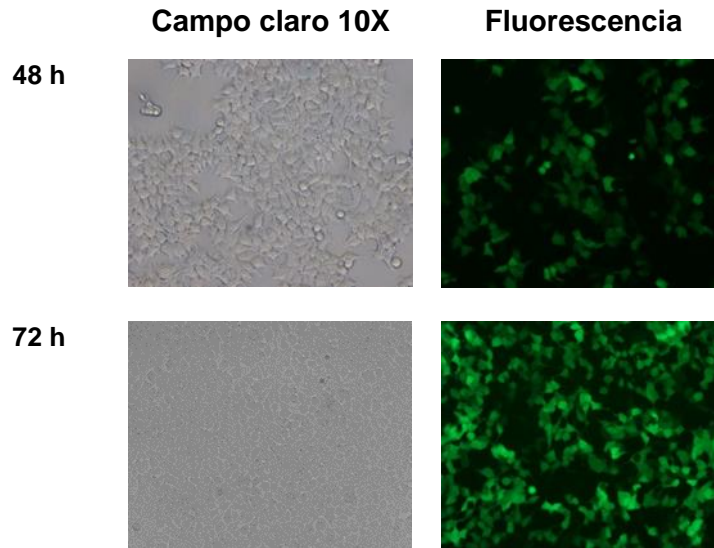


**Figura 44.** Selección con antibiótico de las células HEK-293 T/17 transducidas con 1 PL ZIKV. Amplificación 10 x.

Posteriormente, se inició la selección con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de puromicina. A las 72 h de selección, tanto las células de estudio como los controles se observaron estresadas, ya que no estaban totalmente adheridas a la superficie y tenían forma redonda. A pesar de ello, las células seguían expresando la proteína GFP. Hasta el día 7 el control positivo estaba 100% confluyente con casi todas las células expresando GFP, sin embargo, las células HEK 293T/17 transducidas con 2LP ZIKV tenían una confluencia del 10%, mayor que el control negativo, pero con una morfología muy parecida entre ambos (Figura 46). Afortunadamente, a los 13 días de selección se formaron 6 focos de células HEK293T/17 resistentes a antibiótico que muy probablemente expresaban el transgén ss, ZIKV M-E

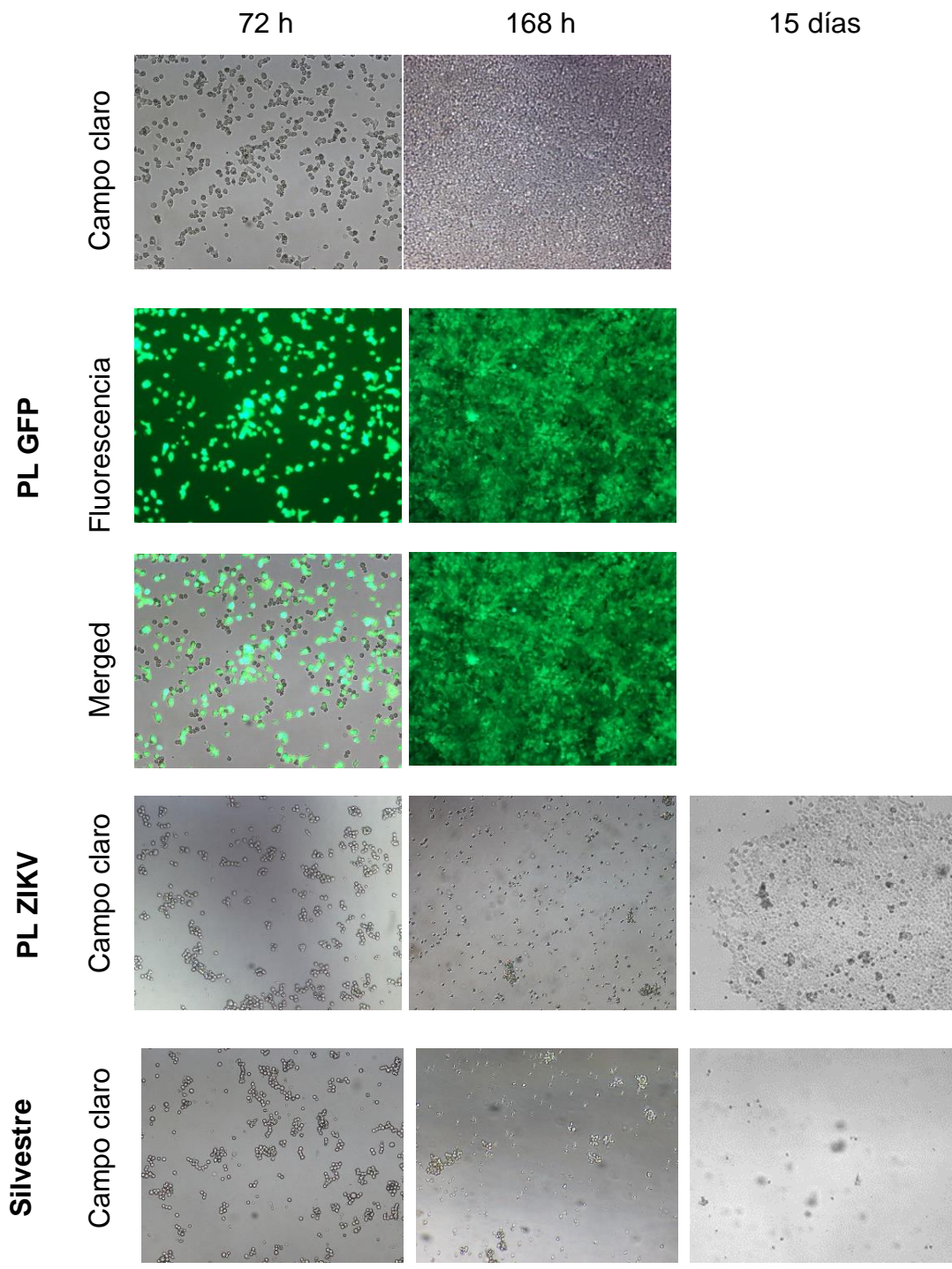


(minus TM), JEV E (TM). El tiempo de formación de focos de células resistentes a antibióticos transducidas con 1LP y 2LP fue semejante.



**Figura 45.** Células HEK-293T/17 transducidas con 2PL GFP (control positivo). Amplificación 10x.

Las células en selección transducidas con 2PL ZIKV fueron menos resistentes al antibiótico, con confluencia del 10% a las 168h, que las células seleccionadas transducidas con LP GFP, probablemente porque las PPV de ZIKV no se ensamblaron de forma adecuada, ya que la proteína M-E expresada secretada y transmembranal pudiera estar interactuando con la proteína de envoltura del lentivirus, interfiriendo con su ensamblaje en la transducción, y por ende en la integración del transgén y del gen de resistencia al antibiótico, caso que no ocurre con el control positivo de LP GFP, que es intracelular sin dominios transmembranales. Asimismo, la MDI utilizada pudo haber influido, ya que este fenómeno no se observó en la producción de PPV rabia, simples y envueltas, en HEK-293T/17. Las PPV de rabia, al igual que las PPV ZIKV, están compuestas por una glicoproteína con dominio transmembranal, sin embargo, la MDI utilizada para la producción de PPV de rabia no fue de 1 sino 20, en donde se estima el 100% de transducción de células según la distribución de Poisson, por ende, la mayoría de las células adquieren el transgén y son resistentes al agente de selección (Fontana 2015; Fontana *et al.*, 2014).



**Figura 46.** Selección con antibiótico de las células HEK-293 T/17 silvestres, transducidas 2PL ZIKV y 2PL GFP. Amplificación 10x.

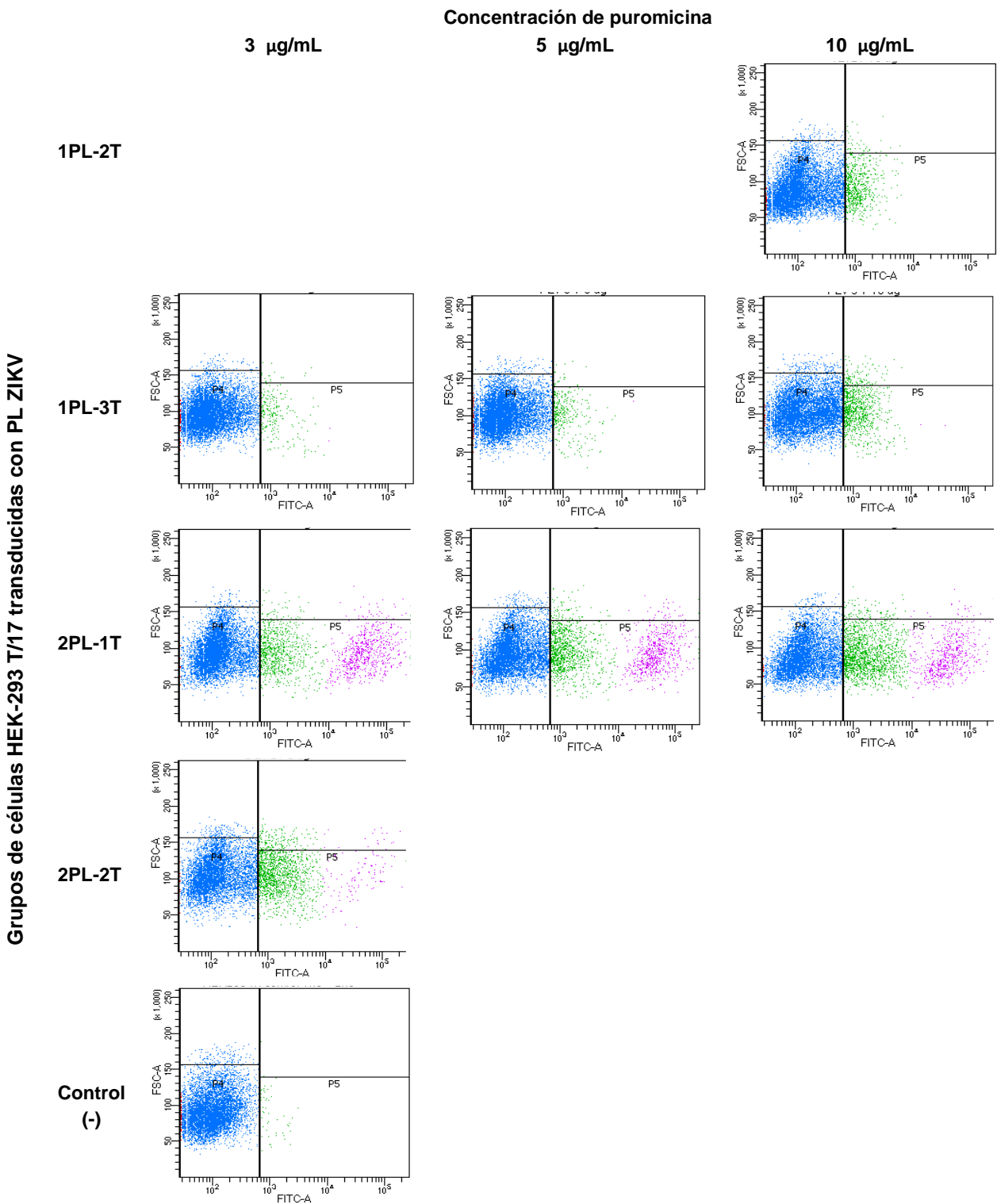
A pesar de lo mencionado anteriormente, fue posible la selección de diferentes grupos de células HEK-293T/17 (Tabla 13) transducidas con las 1 PL con dos y tres transducciones (2T, 3T) y con la 2 PL con una y dos transducciones a diferentes concentraciones de puromicina.

<b>Tabla 13. Grupos de HEK 293T /17</b>	
<b>Grupos</b>	<b>Concentración de puromicina (µg/mL)</b>
<b>1PL-2T</b>	10
<b>1PL-3T</b>	3, 5,10
<b>2PL-1T</b>	3, 5, 10
<b>2PL-2T</b>	2

#### **8.3.2.5 Análisis de la expresión del transgén de ZIKV**

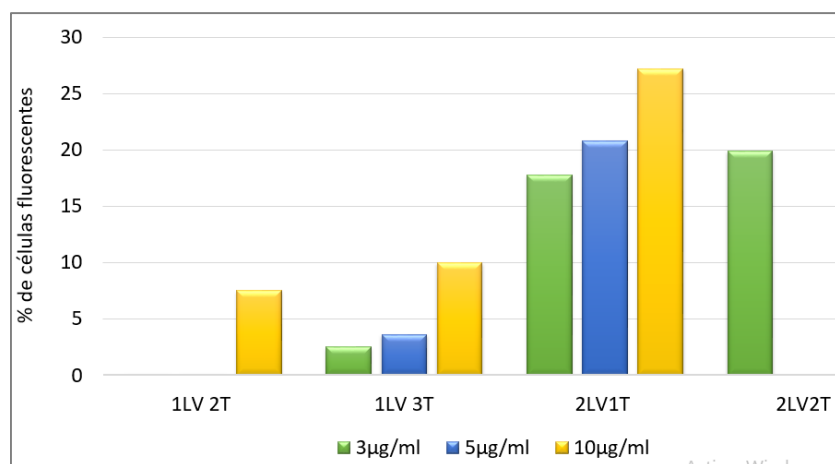
Los grupos de HEK-293-T/17 listadas en la tabla 1 fueron analizadas por citometría de flujo con la finalidad de identificar cuál de ellas expresaba mayor cantidad de la proteína ZIKV M-E (minus TM), JEV E (minus TM) dependiendo del número de transducciones y la concentración del agente de selección. Para ello, las líneas celulares fueron fijadas y permeabilizadas con el anticuerpo monoclonal anti-E ZIKV y el anticuerpo secundario Alexa-Fluor, como se describe en metodología, posteriormente se analizaron 10, 000 eventos por cada línea en el citómetro de flujo.

En la figura 47 podemos observar gráficas de Dot plot en donde el recuadro de P4 corresponde al control negativo es decir células HEK-293 T/17 silvestre permeabilizadas con anticuerpo primario y secundario. El recuadro P5 corresponde a células transducidas con PL ZIKV que expresan la proteína ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM), verde y lila, de donde deriva una población de células con mayor fluorescencia (lila) que expresan más la proteína recombinante, esto fue para el caso de la línea HEK 293 T/17: 2PL1T y 2PL2T.



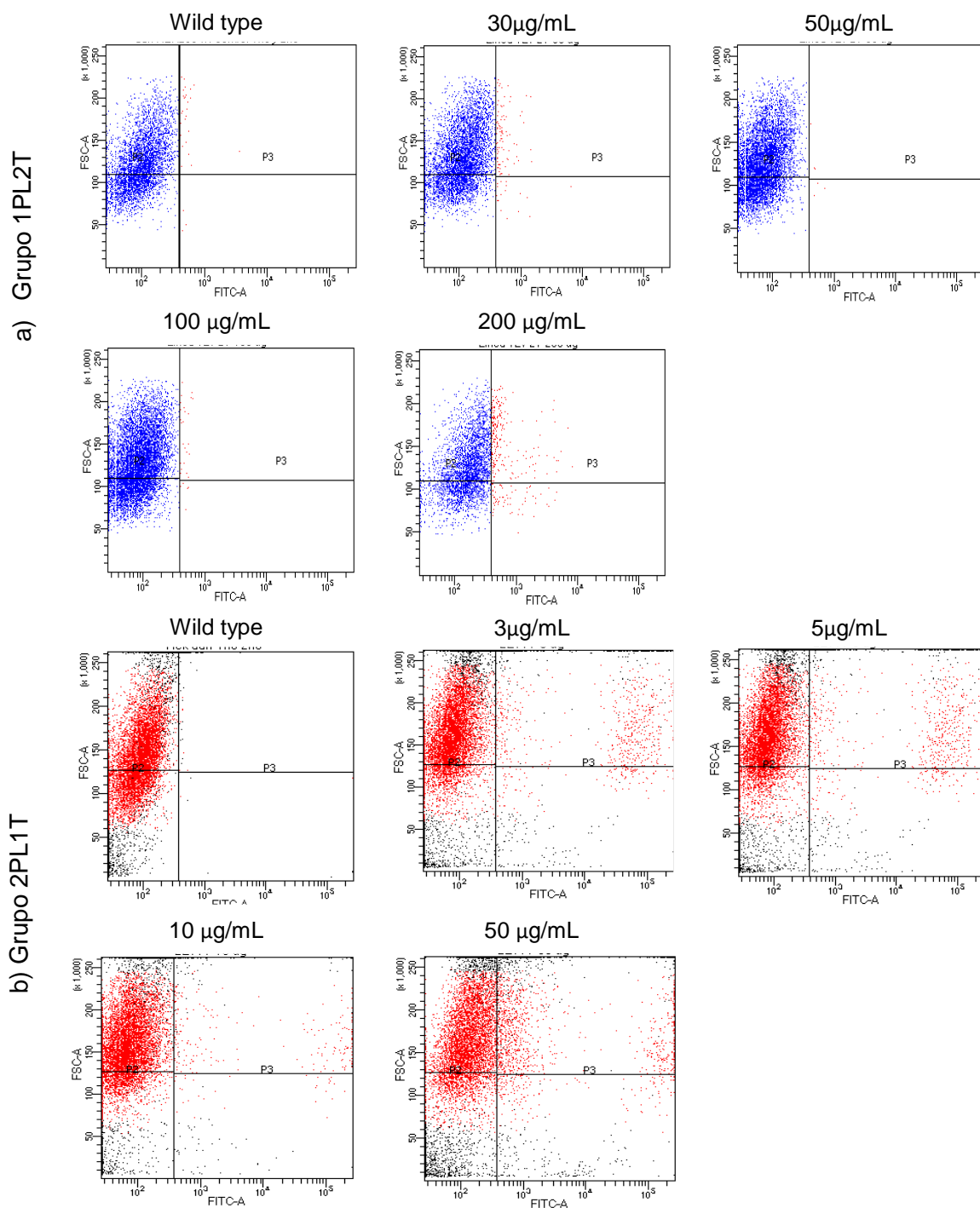
**Figura 47.** Evaluación de la expresión de ZIKV M-E (minus TM, JEV E(TM)) en las células transducidas y seleccionadas a diferentes concentraciones de antibiótico por citometría de flujo. La expresión fue detectada con el AcM monoclonal anti-E ZIKV y el AcM secundario anti-ratón Alexa 488 en el citómetro GUAVA EasyCyte. Número de eventos: 10,000.

El porcentaje de células que expresan la proteína E aumentó al incrementar la concentración de antibiótico (Figura 48). Para la línea 2PL1T, el porcentaje de células positivas incrementó del 18 al 28% al aumentar gradualmente la concentración del antibiótico de 3 a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , manteniéndose constante el porcentaje (8%) de células fluorescentes con mayor intensidad, mientras que el porcentaje de células con menor intensidad aumentó en conjunto. Al aumentar el número de transducciones (adiciones de PL) también incrementó el porcentaje de células que expresaban la proteína E para 2PL2T; a dosis de 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , la expresión fue de 20% pero disminuyó el porcentaje de células con mayor intensidad. Cabe resaltar que las líneas celulares transducidas con las 2LP tienen el triple de células que expresan el transgén en comparación con las líneas celulares transducidas con las 1LP, independientemente del número de transducciones.



**Figura 48.** Análisis por citometría de flujo del porcentaje de células que expresan la proteína ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM) de las células transducidas y seleccionadas a diferentes concentraciones de antibiótico. La expresión fue detectada con el AcM monoclonal anti-E ZIKV y el AcM secundario anti-ratón Alexa 488 en el citómetro GUAVA EasyCyte. Número de eventos: 10 000.

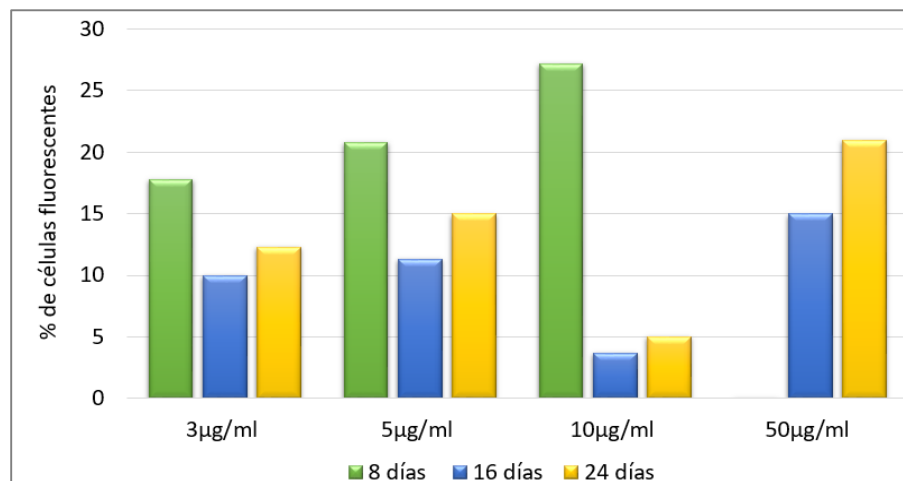
Se decidió continuar incrementando la dosis del agente de selección de la línea 1LP2T y 2LP1T con la finalidad de evaluar si aumentaba la expresión de la proteína E, de igual manera, por citometría de flujo (Figura 49).



**Figura 49.** Evaluación de la expresión de ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM) de la línea a) 1PL 2T y b) 2PL1T a diferentes concentraciones de antibiótico por citometría de flujo. La expresión fue detectada con el AcM monoclonal anti-E ZIKV y el AcM secundario anti-ratón Alexa 488 en el citómetro GUAVA EasyCyte. Número de eventos: 10000. Experimentos independientes.

El grupo 1LP2T (Figura 49-a) se seleccionó gradualmente hasta obtener las dosis de 30, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de las cuales se obtuvo 2, 0.1, 0.3 y 8%, respectivamente de células fluorescentes que expresaban el transgén. Por lo tanto, al aumentar la concentración de puromicina en el grupo 1LP2T, disminuyó la expresión de la proteína E, un efecto opuesto a lo que reportó Prieto *et al.*, 2010, sin embargo, él utilizó una MDI de 2,000 para sus experimentos de transducción. Debido a la baja expresión del transgén, estas células se descartaron.

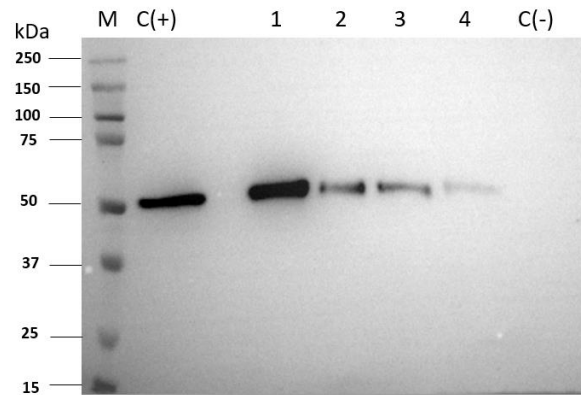
El grupo HEK293T/17 2LP1T (Figura 49-b) se seleccionó gradualmente con 3, 5, 10 hasta 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A estas concentraciones del agente de selección, se alcanzó el 10, 11, 4 y 20%, respectivamente, de células fluorescentes. El porcentaje de células fluorescentes de este ensayo disminuyó en comparación con el primero (Figura 48), debido a que a las concentraciones de 3 y 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , el porcentaje se redujo a la mitad; a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  disminuyó siete veces el porcentaje de células fluorescentes. A causa de este efecto, los grupos de células trasducidas se analizaron 8 días después. En la figura 50 se observa el porcentaje de células fluorescentes del grupo 2PL1T de los tres ensayos de citometría realizados cada 8 días después de la selección.



**Figura 50.** Análisis por citometría de flujo del porcentaje de células que expresan la proteína ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM) del grupo 2LP1T, cada 8 días después de su selección. La expresión fue detectada con el AcM monoclonal anti-E ZIKV y el AcM secundario anti-ratón Alexa 488 en el citómetro GUAVA EasyCyte. Número de eventos: 10, 000.

El porcentaje de células fluorescentes seleccionadas con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  disminuyó drásticamente a través del tiempo de 30 a 5%, mientras que las células seleccionadas con 3 y 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  disminuyeron, pero no más del 5% respecto al valor inicial. Es relevante señalar que el porcentaje de células con mayor intensidad de fluorescencia se mantuvo constante en los tres ensayos. Dado que el grupo de HEK293T/17 2LP1T tiene mayor porcentaje de células que expresan la proteína ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM) se decidió trabajar con este grupo.

Posteriormente, se evaluó la producción de PPV en el sobrenadante del grupo de células 2LP1T seleccionadas con 3, 5, 10 y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de puromicina; para ello, las líneas se amplificaron a formato de T75, a partir del 80% de confluencia se cultivaron por 96 h. El sobrenadante se recuperó y se concentró por colchón de sacarosa al 20% para su análisis por Western blot anti-E ZIKV (Figura 51).

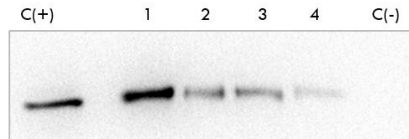


**Figura 51.** Análisis por Western blot anti-proteína E ZIKV del sobrenadante concentrado por colchón de sacarosa del grupo de HEK-293T/17 2LP-1T seleccionadas a diferentes concentraciones de puromicina. M: Marcador; C (+): Control positivo; Carriles 1 a 4: 2LP-1T seleccionada con 3, 5, 10 y 50 de  $\mu\text{g}/\text{mL}$  puromicina, respectivamente. C (-): Control negativo.

Se observó mayor expresión en el sobrenadante del grupo HEK 293T/17 2LP-1T seleccionado con 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de puromicina (carril 1). Aparentemente grupo de células seleccionadas con 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  secretan la misma cantidad de PPV, mientras que las células seleccionadas con 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  muestran menor expresión. Por ende, se decidió trabajar con el grupo 2LP1T seleccionado con 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$  puromicina.



La producción de la proteína ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM) por el grupo recombinante estable (2PL-1T con 3µg/mL del agente de selección) se evaluó a través de los pases. La línea fue amplificada a formato T225, sin puromicina, y el sobrenadante fue concentrado 400 veces por colchón de sacarosa para su evaluación por Western blot anti-proteína E ZIKV (Figura 52). El sobrenadante concentrado del carril 1 al 4 corresponde al pase 3, 6, 9 y 12, respectivamente. La producción de la proteína recombinante disminuyó a través de los pases, muy probablemente porque el 87% de las células que no expresan la proteína tienen menor carga metabólica hay mayor velocidad específica de crecimiento en comparación con el 13% de células que expresan el transgén, por esta razón se decidió realizar la selección clonal.

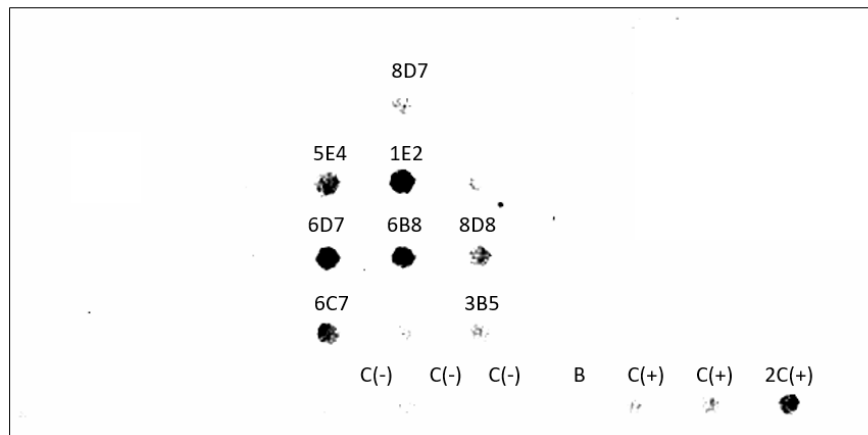


**Figura 52.** Análisis por Western blot anti-proteína E ZIKV de la producción del transgén ZIKV E-M (minus TM) JEV E (TM) a través de pases consecutivos del grupo de HEK-293T/17 2LP 1T con 3 µg/mL del agente de selección. El sobrenadante se concentró 400 veces por colchón de sacarosa. Se cargó por volumen. C (+) control positivo; C (-) Control negativo; Carriles 1 -4: pases 3, 6, 9, 12, respectivamente.

#### 8.3.2.6 Generación de clonas productoras de PPV ZIKV

Con la finalidad de obtener mayor producción de PPV de ZIKV se realizó dilución limitante del grupo 2PL-1T HEK-293T-17 seleccionada con 3 µg/mL puromicina. Para esto, se intentó sembrar una célula por pozo en ocho placas de 96 pozos. El medio fue suplementando con SFB al 20 y 30% de medio metabolizado. Al segundo día se verificó el número de células por pozo; aquellos pozos en los que se sembró de 1 a 4 células fueron monitoreados cada 5 días. En la tercera semana se observaban colonias de células, las cuales fueron amplificadas a placas de 24 y 6 pozos. Se evaluó la presencia de PPV de ZIKV en el sobrenadante de las células seleccionadas por inmunodetección de Dot blot, por duplicado, anti-E de ZIKV con el anticuerpo EDE1 C8 en donde se analizaron 200 µL de 64 muestras utilizando como control negativo sobrenadante de células silvestres y como control positivo 0.4 y 0.8 µL de ZIKV cabe mencionar que en los

Western blot normalmente se usan 30  $\mu$ L de ZIKV (Figura 53). Se obtuvieron 8 señales positivas correspondientes a la expresión de PPV de ZIKV en el sobrenadante del pozo seleccionado. En la tabla 14 se lista el nombre del pozo y el número de células sembradas al inicio. Se obtuvo señal positiva del pozo 8D7, 3B5, 8D8 y 6B8 provenientes de una célula. La clona 6B8 tuvo mayor intensidad por lo que muy probablemente sea la más productora, sin embargo, es necesario un análisis más profundo de las clonas.



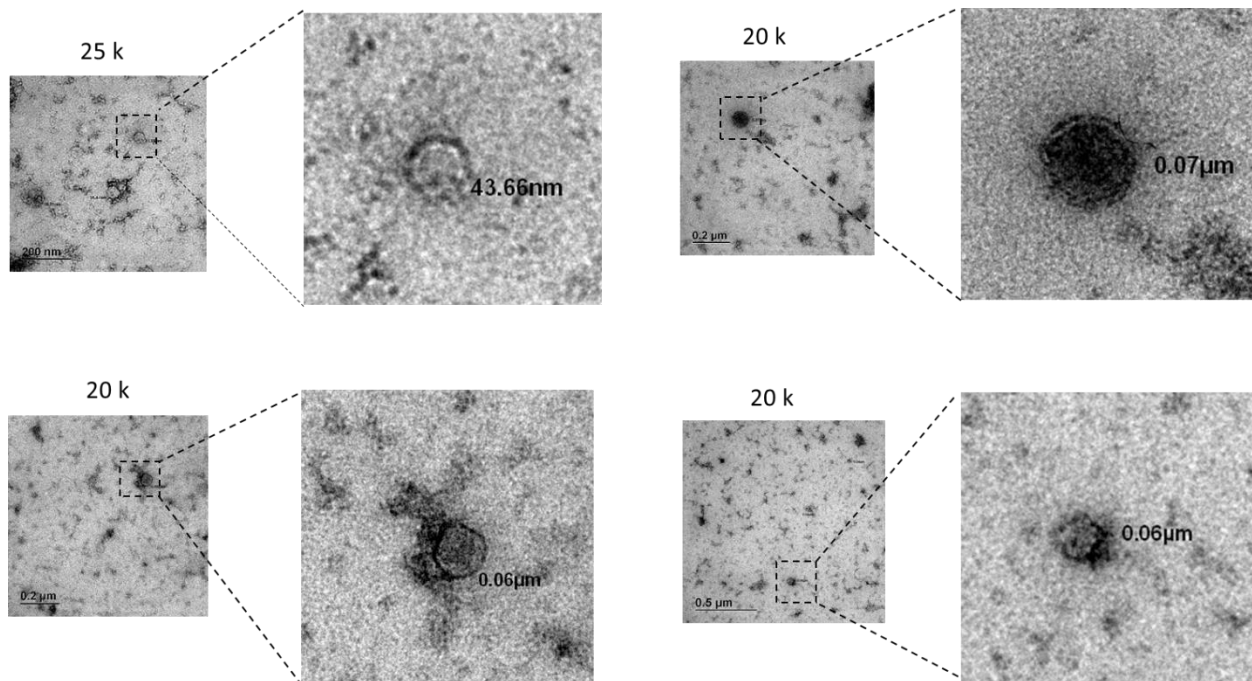
**Figura 53.** Análisis por Dot blot anti-proteína E ZIKV del sobrenadante de la dilución clonal del grupo de HEK 293T/17 2PL1T seleccionada con 3  $\mu$ g de puromicina. C (+): Control positivo 0.4  $\mu$ L de ZIKV; 2C (+): 0.8  $\mu$ L de ZIKV; C (-): Control negativo: sobrenadante de HEK-293T silvestre. Número-letra-número corresponde al nombre del pozo. Anticuerpo primario anti-E ZIKV origen humano.

**Tabla 14. Líneas celulares productoras de PPV ZIKV obtenidas de una o dos células al realizar la dilución limitante**

Línea celular	Número de células en el pozo
5E4	2 células
1E2	2 células
6D7	2 células
6B8	1 célula
8D8	1 célula
6C7	2 células
3B5	1 célula
8D7	1 célula

### 8.3.3 Caracterización y purificación de PPV ZIKV

Los sobrenadantes concentrados por colchón de sacarosa del primer pase generado previamente se juntaron y se analizaron por microscopía electrónica. La muestra fue observada a 20 k y 25 k (Figura 54). Se observaron PPV esféricas, con envoltura y con un diámetro promedio de  $50 \pm 20$  nm de diámetro semejante a las PPV producidas en las células de insecto. El diámetro de las PPV de ZIKV es muy semejante al tamaño esperado para PPV de flavivirus que van desde 30 a 60 nm. Por tanto, si fue posible la formación de PPV M-E (minus TM) ZIKV, (TM) JEV en el sobrenadante de las células HEK-293T/17 de forma estable.



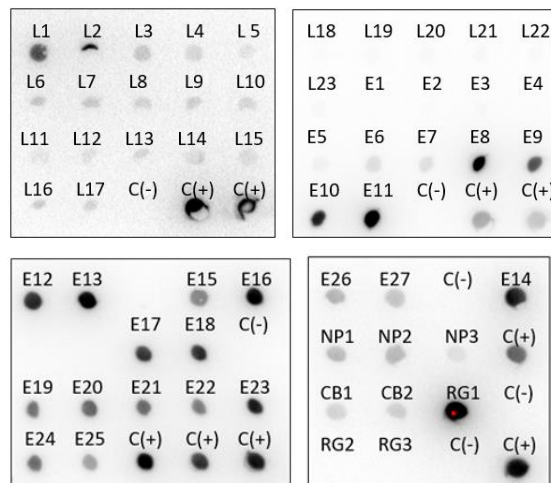
**Figura 54.** Tinción negativa de PPV de M-E (minus TM) ZIKV, TM JEV producidas en el sobrenadante de HEK-293T/17 2LP 1T observadas en MET a diferentes magnificaciones (k).

La resina de afinidad de Sepharosa 4B AcM EDE1 C8, generada como describe en metodología, se utilizó para purificar las PPV producidas por las HEK293T/17 2PL1T. El sobrenadante de los pases 3, 6 y 9 concentrados por ultracentrifugación se resuspendieron en amortiguador HEPES el cual se cambió por PBS al centrifugar las

PPV; al sobrenadante se le denominó (CB). Posteriormente, la purificación se realizó como se resume en la tabla 15.

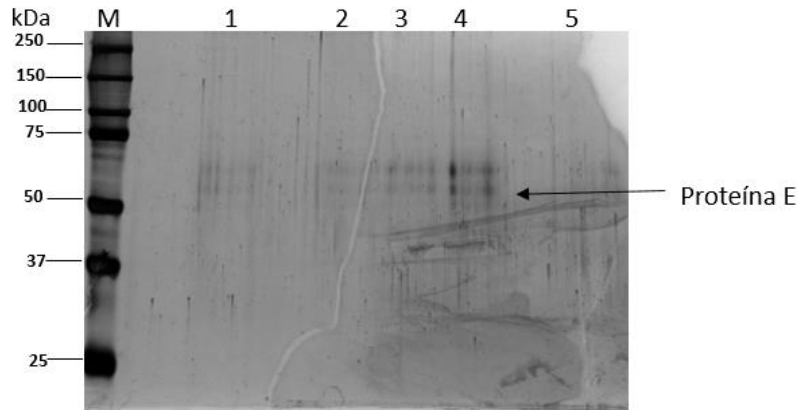
Tabla 15. Purificación de PPV con la resina Sepharosa 4B AcM EDE1 C8					
Paso	Solución	VC	Fracciones colectadas		
			Nombre de la muestra	Volumen colectado	
1	Equilibrio	PBS pH 7.4	15 CV		
2	Muestra	PBS pH 7.4	OVN 4° C	NP	c/u 500 µL
3	Lavados	PBS pH 7.4	12 VC	L	c/u 500 µL
4	Elución	Glicina 0.1M pH 2.75	2.5 VC	E	c/u 100 µL
5	Lavado	PBS pH 7.4	3 VC	-	c/u 500 µL
6	Regeneración	NaCl 1M	15VC	RG	c/u 1 mL

Las fracciones fueron analizadas por Dot blot anti-EDE ZIKV (Figura 55). Las PPV ZIKV fueron retenidas por la resina ya que solo hay señal en las dos primeras fracciones de lavado (L1 y L2) lo cual pudiera deberse a la saturación de la resina. Posteriormente, las PPV fueron eluidas con cambio de pH, obteniéndolas en las fracciones E8-E27. Luego, en las fracciones correspondientes al paso de regeneración hay señal en la primera fracción por lo cual es necesario utilizar otro volumen de columna para eluir completamente la muestra.



**Figura 56.** Análisis por Dot blot anti-EDE ZIKV de las fracciones de purificación por afinidad de PPV ZIKV producidas por las HEK293T/17 2PL1T. L: lavados; E: Elución; NP: No pegado; CB: Cambio de amortiguador; RG: Regeneración; C (+): Control positivo; C (-): Control negativo. 25 µL por pozo de muestra.

Las fracciones de elución se juntaron en cinco partes: F1 (E1-E6), F2 (E7-E11), F3 (E12-E18), F4 (E19-E23) y F5 (E24-E27). La F1-F5 se separó en un gel SDS PAGE revelado con tinción de plata para verificar la pureza de las fracciones (Figura 54). La muestra se concentró en las F3 y F4 que incluye la elución E12 a E23. La pureza mejoró considerablemente de 5 a 50% para ambas fracciones.



**Figura 57.** Análisis por gel SDS-PAGE revelado con tinción de plata de las fracciones de elución de la purificación de PPV ZIKV producidas en HEK293T/17. M: Marcador; Carril 1 - 5: F1 (E1-E6), F2 (E7-E11), F3 (E12-E18), F4 (E19-E23) y F5 (E24-E27). 50  $\mu$ L por pozo.

## 9 CONCLUSIONES

Fue posible diseñar y expresar la químera ss-M-E (minus TM) ZIKV, (TM) JEV en células de insecto y en células de mamífero, ambos huéspedes del ZIKV. Es la primera vez que este tipo de químeras se utiliza para la expresión de PPV de ZIKV. La expresión de la químera en las células de insecto se realizó al generar un baculovirus recombinante que contiene la secuencia que codifica para la químera. Posteriormente mediante cinéticas de infección, se determinaron las condiciones óptimas para un mayor rendimiento de proteína recombinante correspondientes a MDI de 1 ufp/cel en CCI de  $1.3 \times 10^6$  cel/mL y una TCD de 48 h.

Para la expresión de la químera en las células de mamífero, dos estrategias fueron utilizadas. La primera involucró la transfección de las células con el plásmido pcDNA 3.1 que contiene la secuencia de la químera, seguida de una fase de selección con neomicina. Sin embargo, el marcador de selección utilizado, así como el método no fueron favorables para la generación de una línea estable debido a la baja eficiencia de integración en el genoma y por ende bajos rendimientos de producción de proteína recombinante. Una alternativa fue el uso de vectores lentivirales como sistema de transferencia del material genético. Con ellos fue posible la generación de varios de grupos de células recombinantes seleccionadas a diferentes concentraciones de antibiótico. El análisis por citometría de flujo mostró que el grupo 2LP1T contenía el mayor porcentaje de células con expresión de la químera. Siendo el grupo 2LP 1T seleccionada a 3  $\mu\text{g/mL}$  de antibiótico el grupo con mayor expresión de la proteína recombinante en el sobrenadante de las células HEK-293T/17. Posteriormente con la finalidad de obtener mayor producción de la químera se generaron 4 clonas estables productoras la proteína recombinante. La clona 6B8 mostró mayor expresión de la químera en el sobrenadante, sin embargo, es necesario un análisis más profundo de las clonas. Por tanto, a partir del sobrenadante concentrado del grupo 2LP 1T de las células HEK-293T/17 seleccionadas con 3  $\mu\text{g/mL}$  de antibiótico fue posible observar por microscopia electrónica de transmisión las PPV de Zika esféricas de  $50 \pm 20$  nm de diámetro. Asimismo, a partir del sobrenadante concentrado de las células *Sf9* infectadas con el baculovirus recombinante se observaron PPV de Zika esféricas, con envoltura y

de  $50 \pm 20$  nm de diámetro. En ambos sistemas de expresión se observó una baja viabilidad celular, por lo que probablemente la expresión de la químera sea tóxica para las células de insecto, lo que resultó en una drástica caída de la viabilidad de las células infectadas, y afecte la producción de los vectores lentivirales, por la baja eficiencia observada en comparación con otros sistemas similares.

## **10 PERSPECTIVAS**

- 1.- Determinar el patrón de N-glicosilación en las PPV producidas por células de insecto y células humanas.
2. En caso de encontrar patrones de N-glicosilación diferentes, investigar si los patrones de N-glicosilación de las PPV de Zika expresadas en cada sistema influye en la respuesta humoral en un modelo animal para ZIKV.
- 3.- Producir AcM EDE1 C8 con la finalidad de generar una resina de afinidad con mayor capacidad que resulte en mayores rendimientos de PPV de Zika.

## 11 BIBLIOGRAFÍA

- Akahata et al. (2010). A virus-like particle vaccine for epidemic Chikungunya virus protects nonhuman primates against infection. *Nature Medicine*, 16(3), 334–338.
- Akkina et al. (1996). High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *Journal of Virology*, 70(4):2581-2585.
- Annamalai et al. (2017). Zika Virus Encoding Nonglycosylated Envelope Protein Is Attenuated and Defective in Neuroinvasion. *Journal of Virology*, 91(23)
- Bandaranayake et al. (2013). Recent advances in mammalian protein production. *FEBS Letters*, 588(2), 253–260.
- Bisht et al. (2002). Recombinant dengue virus type 2 envelope/hepatitis B surface antigen hybrid protein expressed in *Pichia pastoris* can function as a bivalent immunogen. *Journal of Biotechnology*, 99(2), 97–110.
- Boigard et al. (2017). Zika virus-like particle (VLP) based vaccine. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(5), e0005608.
- Boigard et al. (2018). Dengue-2 virus-like particle (VLP) based vaccine elicits the highest titers of neutralizing antibodies when produced at reduced temperature. *Vaccine*. 36 (50), 7728-7736.
- Büssow (2015). Stable mammalian producer cell lines for structural biology. *Current Opinion in Structural Biology*, 32, 81–90.
- Centers for Disease Control and Prevention, 2019 <https://wwwnc.cdc.gov/travel/page/zika-travel-information>
- Centro de operações de emergências em saúde pública sobre microcefalias. Ministerio da saude Brasil. Informe epidemiológico No 57 – semana epidemiológica (se) 52/2016 (25 a 31/12/2016) monitoramento dos casos de microcefalia no Brasil [Internet]. 2016 [cited 2017 Jan 17]. Available from: [http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2017/janeiro/12/Informe-Epidemiologico-n57-SE-52\\_2016-09jan2017.pdf](http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2017/janeiro/12/Informe-Epidemiologico-n57-SE-52_2016-09jan2017.pdf)
- Chahal et al. (2017). An RNA nanoparticle vaccine against Zika virus elicits antibody and CD8+ T cell responses in a mouse model. *Scientific Reports*, 7(1).252.
- Chang et al. (2000). A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice. *Journal of Virology*, 74(9), 4244–4252.
- Chang et al. (2001). Flavivirus DNA vaccines: current status and potential. *Ann N Y Acad Sci*, 951:272-285.
- Chang et al. (2003). Enhancing biosynthesis and secretion of premembrane and envelope proteins by the chimeric plasmid of dengue virus type 2 and Japanese encephalitis virus. *Virology*, 306(1), 170–180.
- Chavez et al. (2010). Efecto de la densidad celular y la multiplicidad de infección sobre la producción de baculovirus recombinantes en cultivos de células de insecto. *TIP*. 13(2), 65-72.
- Chua et al. (2013). A novel platform for virus-like particle-display of flaviviral envelope domain III: induction of Dengue and West Nile virus neutralizing antibodies. *Virology Journal*, 10(1), 129.
- Crisci et al. (2013). Virus-like particle-based vaccines for animal viral infections. *Inmunología*, 32 (3):102–116.
- Dai et al. (2018). Establishment of baculovirus-expressed VLPs induced syncytial formation assay for Flavivirus antiviral screening. *Viruses*, 10(7), 365.
- Davis et al. (2001). West Nile Virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Virology*, 75(9), 4040–4047.



- De Wispelaere et al. (2015). A lentiviral vector expressing Japanese encephalitis virus-like particles elicits broad neutralizing antibody response in pigs. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(10), e0004081.
- Delenda et al. (2004). Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *The Journal of Gene Medicine*, 6(S1), 125–138.
- Díaz et al (2016). Asian genotype Zika virus detected in traveler returning to Mexico from Colombia, October 2015. *Emerg Infect Dis*. 22 (5) 937-939.
- Duffy et al. (2009). Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *New England Journal of Medicine*. 360 (24)2536–2543.
- Dull et al. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *Journal of virology*, 72(11):8463-8471
- Dutta et al. (2012). Global Epigenetic Changes Induced by SWI2/SNF2 Inhibitors Characterize Neomycin-Resistant Mammalian Cells. *PLoS ONE*, 7(11), 49822.
- Fellner (2016). Zika Virus: Anatomy of a Global Health Crisis. *Pharmaceutic and Therapeutics*. 41(4): 242-253.
- Fernandez et al. (2017). Vaccination strategies against Zika virus. *Current Opinion in Virology*, 23, 59–67.
- Fontana (2015). Desarrollo de una plataforma tecnológica innovadora para producción de vacunas virales recombinantes. Su aplicación al virus de la rabia. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Litoral.
- Fontana et al. (2014). Rabies virus-like particles expressed in HEK293 cells. *Vaccine*, 32(24), 2799–2804.
- Fontes et al. (2017). Functional Analysis of Glycosylation of Zika Virus Envelope Protein. *Cell Reports*, 21(5), 1180–1190.
- Fuenmayor et al. (2017). Production of virus-like particles for vaccines. *New Biotechnology*. 39(B) :174–180.
- Gaillet et al. (2010). High-level recombinant protein production in CHO cells using lentiviral vectors and the cumate gene-switch. *Biotechnology and Bioengineering*, 116 (2),203-2015.
- Gutiérrez et al., (2018). Advancements in mammalian cell transient gene expression (TGE) technology for accelerated production of biologics. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(6), 918–940.
- Hacker et al. (2016). Recombinant protein production from stable mammalian cell lines and s. *Current Opinion in Structural Biology*, 38, 129–136.
- Hennessey et al. (2016). Zika virus spreads to new areas - region of the Americas, May 2015–January 2016. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep*. 65 (3), 55–58.
- Hess et al. (2012) Regulatory, biosafety and safety challenges for novel cells as substrates for human vaccines. *Vaccine*,30:2715–27.
- Hsieh et al. (2008). A strong endoplasmic reticulum retention signal in the stem–anchor region of envelope glycoprotein of dengue virus type 2 affects the production of virus-like particles. *Virology*, 374(2), 338–350.
- Hume et al. (2018). Synthetic biology for bioengineering virus like particles vaccines. *New Biotechnology*.116(4):919-935.
- Jensen et al. (2016). A gradient-free method for the purification of infective dengue virus for protein-level investigations. *Journal of Virological Methods*, 235,125–130.
- Jeong et al. (2017). Exploiting virus-like particles as innovative vaccines against emerging viral infections. *Journal of Microbiology*, 55(3), 220–230.
- Kahlig et al. (2010). Multiplexed transposon-mediated stable gene transfer in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(4), 1343–1348.

- Kim et al. (1990). Use of the human elongation factor 1 $\alpha$  promoter as a versatile and efficient expression system. *Gene*, 91(2), 217–223.
- Kjær et al. (2010). Mammal-restricted elements predispose human RET t.o folding impairment by HSCR mutations. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(6), 726–731
- Klimatcheva et al. (1999). Lentiviral vectors and gene therapy. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 4:D481-496.
- Kong et al. (2009). Transgene expression is associated with copy number and cytomegalovirus promoter methylation in transgenic pigs. *PLoS ONE*, 4(8), 6679.
- Kostyuchenko et al. (2016). Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature*, 533(7603), 425–428.
- Krogh et al. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305(3), 567–580.
- Krol et al. (2019). Production and Biomedical Application of Flavivirus-like Particles. *Trends in Biotechnology*.
- Kuhn. (2019). Flaviviruses: Dengue virus, Yellow fever virus, West Nile virus, Zika virus. Purdue University. Department of Biological Sciences College of Science Recuperado de <https://www.bio.purdue.edu/lab/kuhn/research.html>
- Land et al. (2001). Folding of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in the endoplasmic reticulum. *Biochimie* 83(8), 783–790.
- Lanza et al. (2013). Evaluating the influence of selection markers on obtaining selected pools and stable cell lines in human cells. *Biotechnology Journal*, 8(7), 811–821.
- Larocca et al., (2016). Vaccine protection against Zika virus from Brazil. *Nature*, 536, 474–478.
- Lesh et al., (2010). Viral Vector in Gene Therapy. Application and Novel Production methods. Advanced Symposium and EMBO Practical Course University of Eastern Finland-A.I. Virtanen Institute, Kuopio, Finland.
- Lindenbach et al. (2013) *Fields Virology*, chap. 25, pp. 712–746.
- Liu et al. (2009). Recombinant dengue virus-like particles from *Pichia pastoris*: efficient production and immunological properties. *Virus Genes*, 40(1), 53–59.
- Lua et al. (2014). Bioengineering Virus-Like Particles as Vaccines. *Biotechnology and Bioengineering*. 111(3): 425:440.
- Massad et al. (2016). Estimated Zika virus importations to Europe by travellers from Brazil. *Global Health Action*, 9(1), 31669.
- Mena (2007). Desarrollo de estrategias racionales de producción de pseudo-partículas virales en el sistema de células de insecto baculovirus. Tesis de Dostorado en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología. Universidad Autónoma de México.
- Mena et al. (2003). Titration of Non-Occluded Baculovirus Using a Cell Viability Assay. *BioTechniques*, 34(2), 260–264.
- Mendenhall et al. (2012). Packaging HIV- or FIV-based Lentivector Expression Constructs & Transduction of VSV-G Pseudotyped Viral Particles. *Journal of Visualized Experiments*, (62).
- Merten et al., (2016). Production of lentiviral vectors. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 3, 16017.
- Mukherjee et al. (2016). Enhancing dengue virus maturation using a stable furin over-expressing cell line. *Virology*, 497, 33–40.
- Naldini et al. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 272(5259), 263–267.
- O'Reilly et al. (1994). *Baculovirus expression vectors: a laboratory manual*. Oxford University Press, New York.
- Palomares (1999). Estudio del proceso de producción y ensamblaje de proteínas multimericas a través del sistema células de insecto baculovirus. Tesis de Dostorado en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología. Universidad Autónoma de México.

- Palomares et al. (2001). Cell size as a tool to predict the production of recombinant protein by the insect-cell baculovirus expression system. *Biotechnology Letters*.23, 359–364.
- Palomares et al. (2006). Principles and applications of the insectcell-baculovirus expression vector system. *Cell culture technology for pharmaceutical and cellular applications*. pp 627–692.
- Palomares et al. (2012). Simultaneous expression of recombinant proteins in the insect cell-baculovirus system: Production of virus-like particles. *Methods*, 56(3), 389–395.
- Palomares et al. (2015). An overview of cell culture engineering for the insect cell baculovirus expression vector system (BEVS). *Engineering*,9: 501-519.
- Pardi et al. (2017). Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature*, 543(7644), 248–251.
- PHAO/PLISA/WHO2019  
[http://www.paho.org/data/index.php/en/?option=com\\_content&view=article&id=525&Itemid=](http://www.paho.org/data/index.php/en/?option=com_content&view=article&id=525&Itemid=)
- Plascencia et al. (2011). Strategies for the purification and characterization of protein scaffolds for the production of hybrid nanobiomaterials. *Journal of Chromatography B*, 879(15-16), 1105–1111.
- Prasad et al., (2017). Structure of the immature Zika virus at 9 Å resolution. *Nature Structural & Molecular Biology*, 24(2), 184–186.
- Prieto et al. (2011). A strategy to obtain recombinant cell lines with high expression levels. Lentiviral vector-mediated transgenesis. *BMC Proceedings*, 5(8), 7.
- Rangel et al. (2017). Current trends in Zika vaccine development. *J. Virus Erad.* 3(3): 124-127.
- Retallack (2016). Zika virus cell tropism in the developing human brain and inhibition by azithromycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(50), 14408–14413.
- Richner et al. (2017). Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection. *Cell*. 168,1114–1125.
- Rohrmann et al. (2019). Baculovirus Molecular Biology [Internet]. 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US).
- Roldão et al. (2010). Virus-like particles in vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, 9(10), 1149–1176.
- Rozkov et al. (2008). Large-scale production of endotoxin-free plasmids for transient expression in mammalian cell culture. *Biotechnol. Bioeng.* 99, 557–566.
- Salvo et al. (2018). Zika virus like particles elicit protective antibodies in mice. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(2), e0006210
- Sapparapu et al. (2016). Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice. *Nature*, 540(7633), 443–447.
- Schachter et al. (2009). Paucimannose N-glycans in *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *Carbohydrate Research*. 344(12):1391-1396.
- Sevilla (2018). Generacion de vectores de virus adenoasociados en el sistema células de insecto-baculovirus para el tratamiento de hiperamonemias crónicas. por medio de terapia génica. Tesis de maestría en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología. Universidad Autónoma de México.
- Shan et al. (2017). A single-dose live-attenuated vaccine prevents Zika virus pregnancy transmission and testis damage. *Nat. Commun.* 2017, 8, 676.
- SINAVE/DGE/SS: Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedad por virus del Zika. Hasta agosto 2019.
- Sirohi et al. (2016). The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science*, 352(6284), 467–470.
- Slater et al. (2004). HCV E2 glycoprotein: mutagenesis of N-linked glycosylation sites and its effects on E2 expression and processing. *Virology* 319 (1), 36–48.
- Song et al. (2017). Zika virus: history, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *Journal Neuroimmunology*. 308:50–64.

- Sutton (2002). Production of Lentiviral Vector Supernatants and Transduction of Cellular Targets. *Hematopoietic Stem Cell Protocols*, 275–286.
- Tabata et al. (2016). Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. *Cell Host & Microbe*, 20(2), 155–166.
- Tebas et al. (2017). Safety and immunogenicity of an anti-Zika virus DNA vaccine. *New England Journal of Medicine*. Preliminary report.
- Thompson et al. (2013). Analytical technologies for influenza virus-like particle candidate vaccines: challenges and emerging approaches. *Virology Journal*, 10:141.
- Tokushige et al. (1997). Comparison between cytomegalovirus promoter and elongation factor-1 $\alpha$  promoter-driven constructs in the establishment of cell lines expressing hepatitis C virus core protein. *Journal of Virological Methods*, 64(1), 73–80.
- Vigerust et al. (2007). Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. *Trends in Microbiology*, 15(5), 211–218.
- Vogt et al. (2011) Poorly neutralizing cross-reactive antibodies against the fusion loop of West Nile virus envelope protein protect in vivo via Fc $\gamma$  receptor and complement-dependent effector mechanisms. *Journal of Virology*, 85 (22), 11567–11580.
- Wong et al. (2016). Zika virus infection—the next wave after dengue? *Journal of the Formosan Medical Association*, 115(4), 226–242.
- World Health Organization. (2019). Immunization, Vaccines and Biologics. WHO vaccine pipeline tracker. [https://www.who.int/immunization/research/vaccine\\_pipeline\\_tracker\\_spreadsheet/en/](https://www.who.int/immunization/research/vaccine_pipeline_tracker_spreadsheet/en/)
- World Health Organization. (2017). Sexual transmission of Zika virus: current status, challenges and research priorities. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/259583>. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- Wurm et al. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 22:1393–8,
- Yan et al. (2015). The application of virus-like particles as vaccines and biological vehicles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(24), 10415–10432.
- Yang et al. (2013). mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature*, 497(7448), 217–223.
- Yang et al., (2016). A rapid and efficient polyethylenimine-based transfection method to prepare lentiviral or retroviral vectors: useful for making iPS cells and transduction of primary cells. *Biotechnology Letters*, 38(9), 1631–1641.
- Yang et al., (2017). Optimized PEI-based Transfection Method for Transient Transfection and Lentiviral Production. *Current Protocols in Chemical Biology*, 147–157.
- Yang, M. et al. (2017) Virus-like particles that display Zika virus envelope protein domain III induce potent neutralizing immune responses in mice. *Sci. Rep.* 7, 7679.
- Zhang et al. (2012). Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(1), 105–110.

## 12 APENDÍCE I

Los genes que codifican para las proteínas M-E de la cepa BeH815744 de ZIKV (número de acceso KU365780) que corresponden a los aminoácidos 216-794 (Laroca *et al.*, 2016), fueron identificados y traducidos en el programa *ExPASy-Translate*.

> KU365780.1 M-E\_nt

```
GCTGTGACGCTCCCCTCCCATTCCACTAGGAAGCTGCAAACGCGGTCGCAAACCTGGTTGGAATCAAGAGA
ATACACAAAGCACTTGATTAGAGTCGAAAATTGGATATTTAGGAACCCTGGCTTCGCGTTAGCAGCAGCTG
CCATCGCTTGGCTTTTGGGAAGCTCAACGAGCCAAAAAGTCATATACTTGGTCATGATACTGCTGATTGCC
CCGGCATAACAGCATCAGGTGCATAGGAGTCAGCAATAGGGACTTTTGTGGAAGGTATGTCAGGTGGGACCTG
GGTTGATGTTGTCTTGAACATGGAGGTTGTGTACCCTAATGGCACAGGACAAACCGACTGTGACATAG
AGCTGGTTACAACAACAGTCAGCAACATGGCGGAGGTAAGATCCTACTGCTATGAGGCATCAATATCAGAC
ATGGCTTCGGACAGCCGCTGCCCAACACAAGGTGAAGCCTACCTTGACAAGCAATCAGACACTCAATATGT
CTGCAAAAAGAACGTTAGTGGACAGAGGCTGGGGAAATGGATGTGGACTTTTTGGCAAAGGGAGCCTGGTGA
CATGCGCTAAGTTTGCATGCTCCAAGAAAATGACCGGGAAGAGCATCCAGCCAGAGAATCTGGAGTACCGG
ATAATGCTGTCAGTTCATGGCTCCCAGCACAGTGGGATGATTGTTAATGACACAGGACATGAAACTGATGA
GAATAGAGCGAAAGTTGAGATAACGCCCAATTCACCAAGAGCCGAAGCCACCCTGGGGGGTTTTTGAAGCC
TAGGACTTGATTGTGAACCGAGGACAGGCCTTGACTTTTTCAGATTTGTATTACTTGACTATGAATAACAAG
CACTGGTTGGTTCACAAGGAGTGGTTCACGACATTCCATTACCTTGGCACGCTGGGGCAGACACCGGAAC
TCCACACTGGAACAACAAGAAGCACTGGTAGAGTTCAAGGACGCACATGCCAAAAGGCCAACTGTCTGTGG
TTCTAGGGAGTCAAGAAGGAGCAGTTCACACGGCCCTTGTGAGACTCTGGAGGCTGAGATGGATGGTGCA
AAGGGAAGGCTGTCTCTGGCCACTTGAAATGTCGCTGAAAATGGATAAACTTAGATTGAAGGGCGTGTG
ATACTCCTTGTGTACTGCAGCGTTCACATTCACCAAGATCCCGGCTGAAACACTGCACGGGACAGTCACAG
TGGAGGTACAGTACGCAGGGACAGATGGACCTTGCAAGGTTCCAGCTCAGATGGCGGTGGACATGCAAAC
CTGACCCCAGTTGGGAGGTTGATAACCGCTAACCCGTAATCACTGAAAGCACTGAGAACTCTAAGATGAT
GCTGGAACCTTGATCCACCATTTGGGGACTCTTACATTGTCATAGGAGTCGGGGAGAAGAAGATCACCCACC
ACTGGCACAGGAGTGGCAGCACCATTGGAAAAGCATTGGAAGCCACTGTGAGAGGTGCCAAGAGAATGGCA
GTCTTGGGAGACACAGCCTGGGACTTTGGATCAGTTGGAGGCGCTCTCAACTCATTGGGCAAGGGCATCCA
TCAAATTTTTGGAGCAGCTTCAAATCATTGTTTGGAGGAATGTCTGTTCTCACAAATTCATTTGGAA
CGTTGCTGATGTGGTTGGGTCTGAACACAAAGAATGGATCTATTTCCCTTATGTGCTTGGCCTTAGGGGGA
GTGTTGATCTTCTTATCCACAGCCGTCTCTGCT
```

> KU365780.1 M-E\_aa

```
AVTLPSHSTRKLQTRSQTWLESREYTKHLIRVENWIFRNPGFALAAAAIAWLLGSSTSQKVIYLVMIILLIA
PAYSIRCIGVSNRDFVEGMSGGTWVDVLEHGGCVTVMAQDKPTVDIELVTTTTVSNMAEVRSYCYEASISD
MASDSRCPTQGEAYLDKQSDTQYVCKRTLVDRLGNGCGLFVGKSLVTCAKFACSKKMTGKSIQPENLEYR
IMLSVHGSQHSGMIVNDTGHETDENRAKVEITPNSPRAEATLGGFGSLGLDCEPRTGLDFSDLYYLTMNNK
HWLVHKEWFHDIPLPHAGADTGTPHWNNKEALVEFKDAHAKRQTVVVLGSQEGAVHTALAGALEAEMDGA
KGRLLSSGHLKRLKMDKLRLLKGVSYSLCTAAFTFTKI PAETLHGTVTVEVQYAGTDGPCKVPAQMAVDMQT
LTPVGRRLITANPVITESTENSKMMLELDPPFGDSYIVIGVGEKKITHHWHRSGSTIGKA FEATVRGAKRMA
```

VLGDTAWDFGSVGGALNSLGKGIHQIFGAAFKSLFGGMSWFSQILIGTLLMWLGLNTKNGSISLMCLALGG  
VLIFLSTAVSA

Los genes que codifican para la proteína E de JEV de la cepa SA14-14-2 (número de acceso: KY683775.1) corresponde a los nucleótidos 1- 1500:

> KY683775.1 JEV\_E (1-1500)

```
TTTAATTGCTCTGGGAATGGGCAATCGTGACTTCATAGAAGGAGCCAGTGGAGCCACTTGGGTGGACTTGGT
GCTAGAAGGAGACAGCTGCTTGACAATCATGGCAAACGACAAACCAACATTGGACGTCCGCATGATTAACA
TCGAAGCTAGCCAACTTGCTGAGGTCAGAAGTTACTGCTATCATGCTTCAGTCACTGACATCTCGACGGTG
GCTCGGTGCCCCACGACTGGAGAAGCCCACAACGAGAAGCGAGCTGATAGTAGCTATGTGTGCAAAACAAGG
CTTCACTGACCGTGGGTGGGGCAACGGATGTGGATTTTTTCGGGAAGGGAAGCATTGACACATGTGCAAAAT
TCTCCTGCACCAGTAAAGCGATTGGGAGAACAATCCAGCCAGAAAACATCAAATACAAAGTTGGCATTTTT
GTGCATGGAACCACCACTTCGGAAAACCATGGGAATTATTCAGCGCAAGTTGGGGCGTCCCAGGCGGCAAA
GTTTACAGTAACACCCAATGCTCCTTCGGTAGCCCTCAAACCTGGTGACTACGGAGAAGTCACACTGGACT
GTGAGCCAAGGAGTGGACTGAACACTGAAGCGTTTTACGTCATGACCGTGGGGTCAAAGTCATTTCTGGTC
CATAGGGAGTGGTTTTCATGACCTCGCTCTCCCCTGGACGTCCCCTTCGAGCACAGCGTGGAGAAACAGAGA
ACTCCTCATGGAATTTGAAGGGGCGCACGCCACAAAACAGTCCGTTGTTGCTCTTGGCTCACAGGAAGGAG
GCCTCCATCATGCGTTGGCAGGAGCCATCGTGGTGGAGTACTCAAGCTCAGTGAAGTTAACATCAGGCCAC
CTGAAATGTAGGCTGAAAATGGACAAACTGGCTCTGAAAGGCACAACCTATGGCATGTGTACAGAAAAATT
CTCGTTCGCGAAAAATCCGGTGGACACTGGTCACGGAACAGTTGTCATTGAACTCTCCTACTCTGGGAGTG
ATGGCCCCTGCAAAATTCGATTGTTTCCGTTGCGAGCCTCAATGACATGACCCCCGTTGGGCGGCTGGTG
ACAGTGAACCCCTTCGTCGCGACTTCCAGTGCCAACTCAAAGGTGCTGGTTCGAGATGGAACCCCCCTTCGG
AGACTCCTACATCGTAGTTGGAAGGGGAGACAAGCAGATCAACCACCATTGGCACAAAGCTGGAAGCACGC
TGGGCAAGGCCTTTTTCAACAACCTTTGAAGGGAGCTCAAAGACTGGCAGCGTTGGGCGACACAGCCTGGGAC
TTTGGCTCTATTGGAGGGGTCTTCAACTCCATAGGAAGAGCCGTTACCAAGTGTGTTGGTGGTGCCTTCAG
AACACTCTTTGGGGGAATGTCTTGATCACACAAGGGCTAATGGGTGCCCTACTGCTCTGGATGGGCGTCA
ACGCACGAGACCGATCAATTGCTTTGGCCTTCTTAGCCACAGGAGGTGTGCTCGTGTCTTAGCGACCAAT
GTGCATGCT
```

> KY683775.1 JEV\_E\_aa

```
FNCLGMGNRDFIEGASGATWVDLVLEGDSCCLIMANDKPTLDVRMINIEASQLAEVRSYCYHASVTDISTVA
RCPTTGEAHNEKRADSSYVCKQGFTDRGWNGCGFFGKGSIDTCAKFSCTSKAIGRTIQPENIKYKVGIFV
HGTTTTSEHNHGNYSAQV GASQA AKFTVTPNAPSVALKLG DYGEVTL DCEPRSGLNTEAFYVMTVGSKSFLVH
REWFHDLALPWTSPSS TAWRNRELLMEFEGAHATKQSVVALGSQEGGLHHALAGAI VVEYSSSVKLTSGHL
KCRLKMDKLLALKGTTYGMCTEKFSFAKNPVD TGHGTVVIELSYSGSDGPCKIPIVSVASLNDMTPVGRVLT
VNPFFVATSSANSKVLVEMEPFGDSYIVVGRGDKQINHWHKAGSTLGKAFSTTLKGAQRLAALGDTAWDF
GSIGGVFNSIGRAVHQVFGGAFRTLFGGMSWITQGLMGALLLWMGVNARDRSIALAFLATGGVLVFLATNV
HA
```

Posteriormente, se eliminó la región TM de 50 aminoácidos correspondiente a la proteína E de ZIKV y se seleccionó la región TM de JEV de 50 aminoácidos para sustituirla por la TM de ZIKV:

> KU365780.1 M-E\_nt\_Minus TM (530 al 579)

```
GCTGTGACGCTCCCCTCCCATTCCTACTAGGAAGCTGCAAACGCGGTGCGAAACCTGGTTGGAATCAAGAGAATACACA
AAGCACTTGATTAGAGTCGAAAATTGGATATTTAGGAACCTGGCTTCGCGTTAGCAGCAGCTGCCATCGCTTGGCTT
```

```
TTGGGAAGCTCAACGAGCCAAAAAGTCATATACTTGGTCATGATACTGCTGATTGCCCGGCATACAGCATCAGGTGC
ATAGGAGTCAGCAATAGGGACTTTGTGGAAGGTATGTCAGGTGGGACCTGGGTTGATGTTGTCTTGGAACATGGAGGT
TGTGTCACCGTAATGGCACAGGACAAACCGACTGTCGACATAGAGCTGGTTACAACAACAGTCAGCAACATGGCGGAG
GTAAGATCCTACTGCTATGAGGCATCAATATCAGACATGGCTTCGGACAGCCGCTGCCAACACAAGGTGAAGCCTAC
CTTGACAAGCAATCAGACACTCAATATGTCTGCAAAAAGAACGTTAGTGGACAGAGGCTGGGGAAATGGATGTGGACTT
TTTGGCAAAGGGAGCCTGGTGACATGCGCTAAGTTTGCATGCTCCAAGAAAATGACCGGGAAGAGCATCCAGCCAGAG
AATCTGGAGTACCGGATAATGCTGTCAGTTCATGGCTCCCAGCACAGTGGGATGATTGTTAATGACACAGGACATGAA
ACTGATGAGAATAGAGCGAAAGTTGAGATAACGCCCAATTCACCAAGAGCCGAAGCCACCCCTGGGGGGTTTTTGGGAGC
CTAGGACTTGATTGTGAACCGAGGACAGGCCTTGACTTTTCAGATTTGTATTACTTGACTATGAATAACAAGCACTGG
TTGGTTCACAAGGAGTGGTTCCACGACATTCCATTACCTTGGCAGCTGGGGCAGACACCGGAACTCCACACTGGAAC
AACAAAGAAGCACTGGTAGAGTTCAAGGACGCACATGCCAAAAGGCCAAACTGTCGTGGTTCCTAGGGAGTCAAGAAGGA
GCAGTTCACACGGCCCTTGCTGGAGCTCTGGAGGCTGAGATGGATGGTGCAAAGGGAAGGCTGTCTCTGGCCACTTG
AAATGTCGCCTGAAAATGGATAAACTTAGATTGAAGGGCGTGTACTACTCCTTGTGTACTGCAGCGTTCACATTCACC
AAGATCCCGGCTGAAACACTGCACGGGACAGTACAGTGGAGGTACAGTACGCAGGGACAGATGGACCTTGCAAGGTT
CCAGCTCAGATGGCGGTGGACATGCAAACTCTGACCCAGTTGGGAGGTTGATAACCGCTAACCCCGTAATCACTGAA
AGCACTGAGAACTCTAAGATGATGCTGGAACCTTGATCCACCATTTGGGGACTCTTACATTGTCATAGGAGTCGGGGAG
AAGAAGATCACCCACCCTGGCACAGGAGTGGCAGCACCATTGGAAAAGCATTGGAAGCCACTGTGAGAGGTGCCAAG
AGAATGGCAGTCTTGGGAGACACAGCCTGGGACTTTGGATCAGTTGGAGGCGCTCTCAACTCATTGGGCAAGGGCATC
CATCAAATTTTTGGAGCAGCTTTCAA
```

> JEV\_Env\_TM region

```
ACACTCTTTGGGGGAATGTCTTGGATCACACAAGGGCTAATGGGTGCCCTACTGCTCTGGATGGGCGTCAA
CGCACGAGACCGATCAATTGCTTTGGCCTTCTTAGCCACAGGAGGTGTGCTCGTGTCTTAGCGACCAATG
TGCATGCT
```

> JE signal engeneered (from pCBWN GenBank: HV312997.1)

```
ATGGGCAAGAGGTCCGCCGGCTCAATCATGTGGCTCGCGAGCTTGGCAGTTGTCATAGCTTGTGCAGGCG
CC
```

> JE signal engeneered (from pCBWN) \_ aa

```
MGKRSAGSIMWLASLAVVIACAGA
```

> Kozak secuencia

```
ACCATGG
```

La secuencia de la quimera (ss, ZIKV M-E (minus TM), JEV E (TM)) contiene: la secuencia Kozak, secuencia señal (ss), M-E (minus TM) de ZIKV, TM E de JEV y dos codones de stop, en 1818 nucleótidos, como se muestra a continuación:

>Kozak secuencia JE-signal Zika-M-E (minus TM) JEV-E-TM stop codon

```
ACCATGGGCAAGAGGTCCGCCGGCTCAATCATGTGGCTCGCGAGCTTGGCAGTTGTCATAGCTTGTGCAGG
CGCCGCTGTGACGCTCCCCTCCATTCCACTAGGAAGCTGCAAACGCGGTGCGAAACCTGGTTGGAATCAA
GAGAATACACAAAGCACTTGATTAGAGTCGAAAATTTGGATATTTAGGAACCCTGGCTTCGCGTTAGCAGCA
GCTGCCATCGCTTGGCTTTTGGGAAGCTCAACGAGCCAAAAAGTCATATACTTGGTCATGATACTGCTGAT
TGCCCCGGCATAACAGCATCAGGTGCATAGGAGTCAGCAATAGGGACTTTGTGGAAGGTATGTCAGGTGGGA
CCTGGGTTGATGTTGTCTTGGAACATGGAGGTTGTGTCACCGTAATGGCACAGGACAAACCGACTGTCGAC
ATAGAGCTGGTTACAACAACAGTCAGCAACATGGCGGAGGTAAGATCCTACTGCTATGAGGCATCAATATC
AGACATGGCTTCGGACAGCCGCTGCCAACACAAGGTGAAGCCTACCTTGACAAGCAATCAGACACTCAAT
```

ATGTCTGCAAAGAACGTTAGTGGACAGAGGCTGGGGAAATGGATGTGGACTTTTTGGCAAAGGGAGCCTG  
GTGACATGCGCTAAGTTTGCATGCTCCAAGAAAATGACCGGGAAGAGCATCCAGCCAGAGAATCTGGAGTA  
CCGGATAATGCTGTCAGTTCATGGCTCCCAGCACAGTGGGATGATTGTTAATGACACAGGACATGAAACTG  
ATGAGAATAGAGCGAAAAGTTGAGATAACGCCAATTCACCAAGAGCCGAAGCCACCCTGGGGGGTTTTGGA  
AGCCTAGGACTTGATTGTGAACCGAGGACAGGCCTTGACTTTTCAGATTTGTATTACTTGACTATGAATAA  
CAAGCACTGGTTGGTTCACAAGGAGTGGTTCACACGACATTCCATTACCTTGGCACGCTGGGGCAGACACCG  
GAACTCCACACTGGAACAACAAGAAGCACTGGTAGAGTTCAAGGACGCACATGCCAAAAGGCAAACTGTC  
GTGGTTCTAGGGAGTCAAGAAGGAGCAGTTCACACGGCCCTTGCTGGAGCTCTGGAGGCTGAGATGGATGG  
TGCAAAGGGAAGGCTGTCCTCTGGCCACTTGAAATGTCGCCTGAAAATGGATAAACTTAGATTGAAGGGCG  
TGTCACTACTCCTTGTGTACTGCAGCGTTCACATTCACCAAGATCCCGGCTGAAACACTGCACGGGACAGTC  
ACAGTGGAGGTACAGTACGCAGGGACAGATGGACCTTGCAAGGTTCCAGCTCAGATGGCGGTGGACATGCA  
AACTCTGACCCAGTTGGGAGGTTGATAACCGCTAACCCCGTAATCACTGAAAGCACTGAGAACTCTAAGA  
TGATGCTGGAACCTTGATCCACCATTTGGGGACTCTTACATTGTCATAGGAGTCGGGGAGAAGAAGATCACC  
CACCCTGGCACAGGAGTGGCAGCACCATTTGAAAAGCATTGGAAGCCACTGTGAGAGGTGCCAAGAGAAT  
GGCAGTCTTGGGAGACACAGCCTGGGACTTTGGATCAGTTGGAGGCGCTCTCAACTCATTGGGCAAGGGCA  
TCCATCAAATTTTTGGAGCAGCTTTCAAACACTCTTTGGGGGAATGTCTTTGGATCACACAAGGGCTAATG  
GGTGCCCTACTGCTCTGGATGGGCGTCAACGCACGAGACCGATCAATTGCTTTGGCCTTCTTAGCCACAGG  
AGGTGTGCTCGTGTCTTAGCGACCAATGTGCATGCTTGATAA



### 13 APÉNDICE II

A continuación, se muestra el alineamiento de la secuencia esperada NheI\_ss\_ZIKV M-E minus TM\_JEV E (TM)\_NotI con las lecturas de secuenciación de plásmido pcDNA 3.1 (+) de la colonia 3.

- 1.- Secuencia esperada: NheI\_ss\_ZIKV M-E minus TM\_JEV E (TM)\_NotI
- 2.- Fw-Inserto
- 3.- Rv-Inserto
- 4.- Fw Inserto-Interno
- 5.- Rv-Inserto-Interno

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1>GCTAGCACCATGGGCAAGAGGTCCGCGGCTCAATCATGTGGCTCGCGAGCTTGGCAGTTGTCATAGCTTGTGCAGGCGCCGCTGTGACGCTCCCCCTCCC>100
1>GCTAGCACCATGGGCAAGAGGTCCGCGGCTCAATCATGTGGCTCGCGAGCTTGGCAGTTGTCATAGCTTGTGCAGGCGCCGCTGTGACGCTCCCCCTCCC>100
1051<.....<1051
0>.....>0
942<GCTAGCACCATGGGCAAGAGGTCCGCGGCTCAATCATGTGGCTCGCGAGCTTGGCAGTTGTCATAGCTTGTGCAGGCGCCGCTGTGACGCTCCCCCTCCC<843

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
101>ATTCCACTAGGAAGCTGCAAACGCGGTGCAAACCTGGTTGGAATCAAGAGAATACACAAAGCACTTGATTAGAGTCGAAAATTGGATATTTAGGAACCC>200
101>ATTCCACTAGGAAGCTGCAAACGCGGTGCAAACCTGGTTGGAATCAAGAGAATACACAAAGCACTTGATTAGAGTCGAAAATTGGATATTTAGGAACCC>200
1051<.....<1051
0>.....>0
842<ATTCCACTAGGAAGCTGCAAACGCGGTGCAAACCTGGTTGGAATCAAGAGAATACACAAAGCACTTGATTAGAGTCGAAAATTGGATATTTAGGAACCC<743

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
201>TGGCTTCGGCTTAGCAGCAGCTGCCATCGCTTGGCTTTTGGGAAGCTCAACGAGCCAAAAAGTCATATACTTGGTCATGATACTGCTGATTGCCCCGGCA>300
201>TGGCTTCGGCTTAGCAGCAGCTGCCATCGCTTGGCTTTTGGGAAGCTCAACGAGCCAAAAAGTCATATACTTGGTCATGATACTGCTGATTGCCCCGGCA>300
1051<.....<1051
0>.....>0
742<TGGCTTCGGCTTAGCAGCAGCTGCCATCGCTTGGCTTTTGGGAAGCTCAACGAGCCAAAAAGTCATATACTTGGTCATGATACTGCTGATTGCCCCGGCA<643

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
301>TACAGCATCAGGTGCATAGGAGTCAGCAATAGGGACTTTGTGGAAGGTATGTCAGGTGGGACCTGGGTTGATGTTGTCTTGGAACATGGAGGTTGTGTCA>400
301>TACAGCATCAGGTGCATAGGAGTCAGCAATAGGGACTTTGTGGAAGGTATGTCAGGTGGGACCTGGGTTGATGTTGTCTTGGAACATGGAGGTTGTGTCA>400
1051<.....<1051
0>.....>0
642<TACAGCATCAGGTGCATAGGAGTCAGCAATAGGGACTTTGTGGAAGGTATGTCAGGTGGGACCTGGGTTGATGTTGTCTTGGAACATGGAGGTTGTGTCA<543

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
401>CCGTAATGGCACAGGACAAACCGACTGTCGACATAGAGCTGGTTACAACAACAGTCAGCAACATGGCGGAGGTAAGATCCTACTGCTATGAGGCATCAAT>500
401>CCGTAATGGCACAGGACAAACCGACTGTCGACATAGAGCTGGTTACAACAACAGTCAGCAACATGGCGGAGGTAAGATCCTACTGCTATGAGGCATCAAT>500
1051<.....<1051
0>.....>0
542<CCGTAATGGCACAGGACAAACCGACTGTCGACATAGAGCTGGTTACAACAACAGTCAGCAACATGGCGGAGGTAAGATCCTACTGCTATGAGGCATCAAT<443

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
501>ATCAGACATGGCTTCGGACAGCCGCTGCCCAACACAAGGTGAAGCCTACCTTGACAAGCAATCAGACACTCAATATGTCTGCAAAGAACGTTAGTGGAC>600
501>ATCAGACATGGCTTCGGACAGCCGCTGCCCAACACAAGGTGAAGCCTACCTTGACAAGCAATCAGACACTCAATATGTCTGCAAAGAACGTTAGTGGAC>600
1051<.....<1051
0>.....>0
442<ATCAGACATGGCTTCGGACAGCCGCTGCCCAACACAAGGTGAAGCCTACCTTGACAAGCAATCAGACACTCAATATGTCTGCAAAGAACGTTAGTGGAC<343
```

```

* * * * *
601>AGAGGCTGGGAAATGGATGTGGACTTTTTGGCAAAGGGAGCCTGGTACATGCGCTAAGTTTGCATGCTCCAAGAAAATGACCGGGAAGAGCATCCAGC>700
601>AGAGGCTGGGAAATGGATGTGGACTTTTTGGCAAAGGGAGCCTGGTACATGCGCTAAGTTTGCATGCTCCAAGAAAATGACCGGGAAGAGCATCCAGC>700
1051<.....>1051
0>.....>0
342<AGAGGCTGGGAAATGGATGTGGACTTTTTGGCAAAGGGAGCCTGGTACATGCGCTAAGTTTGCATGCTCCAAGAAAATGACCGGGAAGAGCATCCAGC>243
* * * * *
701>CAGAGAATCTGGAGTACCGGATAATGCTGTCAGTTCATGGCTCCAGCAGCAGTGGGATGATTGTTAATGACACAGGACATGAAACTGATGAGAATAGAGC>800
701>CAGAGAATCTGGAGTACCGGATAATGCTGTCAGTTCATGGCTCCAGCAGCAGTGGGATGATTGTTAATGACACAGGACATGAAACTGATGAGAATAGAGC>800
1050<.....~ATGACACAGGACATGAAACTGATGAGAATAGAGC>1017
1>.....~ATAGAGC>7
242<CAGAGAATCTGGAGTACCGGATAATGCTGTCAGTTCATGGCTCCAGCAGCAGTGGGATGATTGTTAATGACACAGGACATGAAACTGATGAGAATAGAGC>143
* * * * *
801>GAAAGTTGAGATAACGCCCAATTACCAAGAGCCGAAGCCACCCCTGGGGGG~TTTTGGAAGCCTAGGACTTGATTGTGAACCGAGGACAGGCCTTGACTT>899
801>GAAAGTTGAGATAACGCCCAATTACCAAGAGCCGAAGCCACCCCTGGGGGG~TTTTGGAAGCCTAGGACTTGATTGTGAACCGAGGACAGGCCTTGACTT>900
1016<GAAAGTTGAGATAACGCCCAATTACCAAGAGCCGAAGCCACCCCTGGGGGG~TTTTGGAAGCCTAGGACTTGATTGTGAACCGAGGACAGGCCTTGACTT>918
8>GAAAGTTGAGATAACGCCCAATTACCAAGAGCCGAAGCCACCCCTGGGGGG~TTTTGGAAGCCTAGGACTTGATTGTGAACCGAGGACAGGCCTTGACTT>106
142<GAAAGTTGAGATAACGCCCAATTACCAAGAGCCGAAGCCACCCCTGGGGGG~TTTTGGAAGCCTAGGACTTGATTGTGAACCGAGGACAGGCCTTGACTT>44
* * * * *
900>TTCAGATTGTATTACTTGACTATGAATAACAAGCACTGGTTGGTTCACAAGGAGTGGTT~CCACGACATTCATTACCTTGGCAGCTGGGGCAGACAC>998
901>TTCAGATTGTATTACTTGACTATGAATAACAAGCACTGGTTGGTTCACAAGGAGTGGTT~CCACGACATTCATTACCTTGGCAGCTGGGGCAGACAC>1000
917<TTCAGATTGTATTACTTGACTATGAATAACAAGCACTGGTTGGTTCACAAGGAGTGGTT~CCACGACATTCATTACCTTGGCAGCTGGGGCAGACAC>819
107>TTCAGATTGTATTACTTGACTATGAATAACAAGCACTGGTTGGTTCACAAGGAGTGGTT~CCACGACATTCATTACCTTGGCAGCTGGGGCAGACAC>205
43<TTCAGATTGTATTACTTGACTATGAATAACAAGCACTGGTTG.....>1
* * * * *
999>CGGAACCTCCACACTGGAACAACAAGAAGCACTGGTAGAGTTCAAGGACGCACATGCCAAAAGGCAAACCTGTCGTGGTTCTAGGGAGTCAAGAAGGAGCA>1098
1000>.....>1000
818<CGGAACCTCCACACTGGAACAACAAGAAGCACTGGTAGAGTTCAAGGACGCACATGCCAAAAGGCAAACCTGTCGTGGTTCTAGGGAGTCAAGAAGGAGCA>719
206>CGGAACCTCCACACTGGAACAACAAGAAGCACTGGTAGAGTTCAAGGACGCACATGCCAAAAGGCAAACCTGTCGTGGTTCTAGGGAGTCAAGAAGGAGCA>305
1<.....>1
* * * * *
1099>GTTTCACACGGCCCTTGTGGAGCTCTGGAGGCTGAGATGGATGGTGCAAAAGGGAAGGCTGTCCTCTGGCCACTTGAATGTCGCCTGAAAATGGATAAAC>1198
1000>.....>1000
718<GTTTCACACGGCCCTTGTGGAGCTCTGGAGGCTGAGATGGATGGTGCAAAAGGGAAGGCTGTCCTCTGGCCACTTGAATGTCGCCTGAAAATGGATAAAC>619
306>GTTTCACACGGCCCTTGTGGAGCTCTGGAGGCTGAGATGGATGGTGCAAAAGGGAAGGCTGTCCTCTGGCCACTTGAATGTCGCCTGAAAATGGATAAAC>405
1<.....>1
* * * * *
1199>TTAGATTGAAGGCGTGTGCATACTCCTTGTGTAAGTGCAGCGTTCACATTCACCAAGATCCCGGCTGAAACACTGCACGGGACAGTCCAGTGGAGGTACA>1298
1000>.....>1000
618<TTAGATTGAAGGCGTGTGCATACTCCTTGTGTAAGTGCAGCGTTCACATTCACCAAGATCCCGGCTGAAACACTGCACGGGACAGTCCAGTGGAGGTACA>519
406>TTAGATTGAAGGCGTGTGCATACTCCTTGTGTAAGTGCAGCGTTCACATTCACCAAGATCCCGGCTGAAACACTGCACGGGACAGTCCAGTGGAGGTACA>505
1<.....>1
* * * * *
1299>GTACGCAGGGACAGATGGACCTTGCAAGGTTCCAGCTCAGATGGCGGTGGACATGCAAACTCTGACCCAGTGGGAGGTTGATAAACCCTAACCCCGTA>1398
1000>.....>1000
518<GTACGCAGGGACAGATGGACCTTGCAAGGTTCCAGCTCAGATGGCGGTGGACATGCAAACTCTGACCCAGTGGGAGGTTGATAAACCCTAACCCCGTA>419
506>GTACGCAGGGACAGATGGACCTTGCAAGGTTCCAGCTCAGATGGCGGTGGACATGCAAACTCTGACCCAGTGGGAGGTTGATAAACCCTAACCCCGTA>605
1<.....>1
* * * * *
1399>ATCACTGAAAGCACTGAGAACTCTAAGATGATGCTGGAACCTTGATCCACCAATTTGGGGACTCTTACATTGTCATAGGAGTCGGGGAGAAGAAGATCACCC>1498
1000>.....>1000
418<ATCACTGAAAGCACTGAGAACTCTAAGATGATGCTGGAACCTTGATCCACCAATTTGGGGACTCTTACATTGTCATAGGAGTCGGGGAGAAGAAGATCACCC>319
606>ATCACTGAAAGCACTGAGAACTCTAAGATGATGCTGGAACCTTGATCCACCAATTTGGGGACTCTTACATTGTCATAGGAGTCGGGGAGAAGAAGATCACCC>705
1<.....>1

```

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1499>ACCACCTGGCACAGGAGTGGCAGCACCATTTGAAAAGCATTGGAAGCCACTGTGAGAGGTGCCAAGAGAATGGCAGTCTTGGGAGACACAGCCTGGGACTT>1598
1000>.....>1000
318<ACCACCTGGCACAGGAGTGGCAGCACCATTTGAAAAGCATTGGAAGCCACTGTGAGAGGTGCCAAGAGAATGGCAGTCTTGGGAGACACAGCCTGGGACTT<219
706>ACCACCTGGCACAGGAGTGGCAGCACCATTTGAAAAGCATTGGAAGCCACTGTGAGAGGTGCCAAGAGAATGGCAGTCTTGGGAGACACAGCCTGGGACTT>805
1<.....<1

```

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1599>TGGATCAGTTGGAGGCGCTCTCAACTCATTGGGCAAGGGCATCCATCAAATTTTTGGAGCAGCTTTCAAAACACTCTTTGGG-GGAATGTCTTGGATCAC>1697
1000>.....>1000
218<TGGATCAGTTGGAGGCGCTCTCAACTCATTGGGCAAGGGCATCCATCAAATTTTTGGAGCAGCTTTCAAAACACTCTTTGGG-GGAATGTCTTGGATCAC<120
806>TGGATCAGTTGGAGGCGCTCTCAACTCATTGGGCAAGGGCATCCATCAAATTTTTGGAGCAGCTTTCAAAACACTCTTTGGG-GGAATGTCTTGGATCAC>905
1<.....<1

```

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1698>ACAAGGGCTAATGGGTGCCCTACTGCTCTGGATGGGCGTCAACGCACGAGACCGATCAATTGCTTTGGCCTTCTTAGCCACAGGAGGTGTGCTCGTGTT>1797
1000>.....>1000
119<ACAAGGGCTAATGGGTGCCCTACTGCTCTGGATGGGCGTCAACGCACGAGACCGATCAATTGCTTTGGCCTTCTTAGCCACAGGAGGTGTGCTCGTGTT<20
906>ACAAGGGCTAATGGGTGCCCTACTGCTCTGGATGGGCGTCAACGCACGAGACCGATCAATTGCTTTGGCCTTCTTAGCCACAGGAGGTGTGCTCGTGTT>1005
1<.....<1

```

```

      *      *      *      *
1798>TTAGCGACCAATGTGCATGCTTGATAAGCGGCCGC>1832
1000>.....>1000
19<TTAGCGACCAATGTGCATG>.....<1
1006>TTAGCGACCAATGTGCATGCTTGATAAGCGGCCGC>1040
1<.....<1

```