



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

DESARROLLO DE UN CANDIDATO A VACUNA DUAL CONTRA LOS VIRUS
DENGUE Y ZIKA MEDIANTE LA PRESENTACIÓN DE UN MIMÓTOPO EN LA
CÁPSIDE DE VIRUS ADENO-ASOCIADO DEL SEROTIPO 8

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Blgo. Arturo Liñan Torres

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Laura A. Palomares

Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Martin Gustavo Pedraza Alva

Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Miguel Ángel Torres Vega

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Cuernavaca, Morelos. Junio, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio de Ingeniería de Bioprocesos y Nanobiotecnología del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Laura A. Palomares. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de la beca de maestría no. 493129 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT. Investigación realizada gracias al programa UNAM PAPIIT IT200315, IT200418 e IT200521, y la AMEXCID-Secretaría de Relaciones Exteriores.

DEDICATORIA

A mi madre, Odilia Torres Bellido, por su amor inmenso, pero sobre todo por enseñarme a “nunca rendirme” y heredarme “la fuerza de voluntad inquebrantable”, mi fuente de energía ilimitada para hacer mis sueños realidad.

A la Dra. Laura A. Palomares por ser mi mentora y marcar mi camino con la frase “Puedes brillar afuera, pero puedes ser una luz que brille aún más para las nuevas generaciones en tu país de origen”.

A todos los científicos que han trabajado, trabajan y trabajarán muy arduo para desarrollar vacunas contra diversos patógenos causantes de problemas de salud como las pandemias.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laura Palomares, mi tutora y mentora, por aceptarme como alumno y permitirme ser parte de su grupo de investigación, por dirigir mi tesis de maestría, por todo su apoyo, su confianza, sus enseñanzas, y, sobre todo, por ser una luz e inspirarme a seguir mi formación profesional en el área de la tecnología de vacunas.

Al Dr. Tonatiuh Ramírez por haberme aceptado en su grupo de investigación, por sus consejos y sugerencias para el desarrollo de este proyecto.

A las Técnico Académico M.C. Ruth Pastor, M.C. Martha Contreras y M.C. Vanessa Hernández por todo su apoyo, sus consejos y su paciencia, particularmente a Martha por capacitarme en técnicas de cultivo celular; y en especial, a Ruth, quien además de haber sido incondicional para que este trabajo pueda realizarse por su participación en diversas etapas de este trabajo, se convirtió en una gran amiga para mí.

A los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Gustavo Pedraza y el Dr. Miguel Torres, por sus consejos, por siempre ponerme la valla alta y con esto impulsarme a ser cada vez mejor en el desarrollo de este proyecto.

A los miembros del jurado, el Dr. Alejandro Alagón, el Dr. Tomas López, el Dr. Enrique Rudiño, la Dra. Blanca Ruíz y el Dr. Ramón González, por sus observaciones para la mejora de este trabajo.

A los colaboradores del New York Structural Biology Center (NYSBC), el Dr. Mykhailo Kopylov, la Técnico de Investigación Carolina Hernández, la Dra. Bridget Carragher y el Dr. Clint Potter, por su apoyo en el análisis de las cápsides modificadas por criomicroscopía electrónica.

Al Bioterio del Instituto de Biotecnología (IBt), en especial a la M.V.z. Elizabeth Mata y M.V.z. Graciela Cabeza por su apoyo y asesoría en el trabajo con los ratones.

A la Dra. Guadalupe Zavala de la Unidad de Microscopía Electrónica por su ayuda en la obtención de micrografías de las cápsides.

Al M.C. Alejandro Olvera por sus consejos y ayuda técnica en la estandarización de la prueba de ELISA.

Al M.E.M. David Castañeda de la Unidad de Computo por su asistencia técnica incondicional y ser un gran amigo.

Al “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado” (PAEP) por las subvenciones otorgadas para asistir a eventos donde pude presentar mi trabajo de la maestría.

A la Lic. Karin Levy y a la Biol. Larisa Campos del grupo Palomares-Ramírez (GPR), al Lic. Antonio Bolaños y Gloria Villa de la Unidad de Docencia y Formación de Recursos Humanos, y al L.I. Omar Arriaga de la Unidad de Biblioteca, por su apoyo administrativo.

A todos los miembros del GPR por su apoyo y amistad. En especial a Violeta Guadarrama, Juan Carlos Rivera, Jocelyn Uribe, Enrique Paz, Yahel López, Laura Sevilla, Esmeralda Cuevas, Wendy Meza, Berenice Sandoval, Ricardo Lizardi, Michelle Gutiérrez y Ana Alcalá.

A mis amigos de la generación de maestría, en especial a Alejandra, Mario, Jorge, Jaime, Paco, Marieli, Daniel y Elsa.

A mis queridos amigos Hugo Castelán y Carmen Contreras, que siempre estuvieron para mí en las buenas y en las malas, me apoyaron, me escucharon y rieron conmigo.

A mi familia por todo el apoyo y cariño brindado, en especial a mi tío Héctor Torres, a mi tía Norma Torres y a mi tía Betty Ayme que siempre han estado conmigo a pesar de la distancia.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE GENERAL.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
ABREVIATURAS.....	xv
RESUMEN	xviii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Virus dengue (DenV) y virus Zika (ZikV)	3
2.1.1. <i>Virología.....</i>	3
2.1.2. <i>Transmisión</i>	5
2.1.3. <i>Infección</i>	6
2.1.4. <i>Distribución</i>	8
2.2. Desarrollo de vacunas	10
2.2.1. <i>Definición y plataformas de vacuna</i>	10
2.2.2. <i>Vacunas candidatas contra DenV y ZikV.....</i>	12
2.3. Fenómeno ADE y vacuna dual contra DenV y ZikV	13
2.3.1. <i>Fenómeno ADE en DenV y ZikV.....</i>	13
2.3.2. <i>La importancia de una vacuna dual contra DenV y ZikV, y epítomos de la proteína E</i>	18
2.3.3. <i>Mimótopos como candidatos vacunales y su uso contra DenV y ZikV .</i>	20
2.4. Virus adeno-asociado (VAA)	23
2.5. Uso de VAA para el desarrollo de vacunas	26
2.5.1. <i>Vectores virales de VAA</i>	26
2.5.2. <i>Andamios de VAA para despliegue de péptidos.....</i>	26
2.6. Obtención de partículas pseudovirales de VAA.....	30
2.7. Caracterización y evaluación de eficacia de vacunas candidatas.....	31
3. HIPÓTESIS.....	33
4. OBJETIVOS	33
4.1. General.....	33
4.2. Específicos	33
5. MATERIALES Y MÉTODOS	34

5.1. Plásmidos	35
5.2. Virus	36
5.3. Líneas y cultivos celulares.....	37
5.4. Construcción del plásmido pSR660M1	38
5.5. Producción del baculovirus recombinante bacCapMod.....	41
5.5.1. <i>Generación del bácido recombinante</i>	41
5.5.2. <i>Transfección de células Sf9.....</i>	44
5.5.3. <i>Ensayo en placa para aislamiento de placas virales y selección de baculovirus para generar stock viral</i>	45
5.5.4. <i>Amplificación de stocks de baculovirus.....</i>	46
5.5.5. <i>Titulación de baculovirus</i>	47
5.6. Cuantificación de proteína total.....	48
5.7. SDS-PAGE y Western blot.....	49
5.8. Dot blot.....	50
5.9. Producción, purificación y caracterización de cápsides de VAA-8.....	51
5.9.1. <i>Producción y extracción de cápsides.....</i>	51
5.9.2. <i>Evaluación de proteólisis de las proteínas VPs</i>	53
5.9.3. <i>Purificación de cápsides de VAA por gradiente de iodixanol</i>	53
5.9.4. <i>Microscopía electrónica de transmisión (MET)</i>	56
5.9.5. <i>Criomicroscopía electrónica (crioME)</i>	57
5.10. Producción de DenV-2 y de ZikV	58
5.10.1. <i>Propagación de DenV-2 y de ZikV.....</i>	58
5.10.2. <i>Titulación viral mediante la prueba de focos.....</i>	58
5.10.3. <i>Inactivación de DenV-2 y ZikV mediante luz ultravioleta</i>	60
5.11. Inmunización de ratones	60
5.11.1. <i>Aprobación del proyecto por el comité de bioética.....</i>	60
5.11.2. <i>Inmunización de ratones BALB/c.....</i>	60
5.12. Evaluación de la respuesta inmune humoral	65
5.12.1. <i>Método de ELISA indirecto</i>	65
5.12.2. <i>Procesamiento de datos y determinación del título de anticuerpos IgG</i>	66
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	68
6.1. Construcción del plásmido pSR660M1	68
6.2. Construcción del baculovirus recombinante bacCapMod	73

6.2.1. Generación del bácmido recombinante	73
6.2.2. Transfección de células Sf9.....	76
6.2.3. Ensayo en placa para aislamiento de placas virales y selección de baculovirus para obtener stock viral.....	80
6.2.4. Amplificación y titulación de baculovirus.....	82
6.3. Producción, purificación y caracterización de cápsides de VAA-8.....	83
6.3.1. Producción de cápsides.....	83
6.3.2. Evaluación de proteólisis de las proteínas VPs	86
6.3.3. Purificación de cápsides de VAA por gradiente de iodixanol.....	91
6.4. Producción de DenV-2 y de ZikV	107
6.4.1. Propagación de DenV-2 y ZikV.....	107
6.4.2. Titulación viral mediante la prueba de focos.....	109
6.4.3. Inactivación de DenV-2 y ZikV mediante luz ultravioleta	110
6.5. Inmunización y evaluación de la respuesta inmune humoral	110
6.5.1. Primer diseño experimental	111
6.5.2. Segundo diseño experimental.....	114
7. CONCLUSIONES.....	122
8. PERSPECTIVAS	123
9. REFERENCIAS	124
10. ANEXOS.....	139
Anexo 1. Plásmidos empleados en este trabajo	139
Anexo 2. Verificación de la secuencia del gen <i>cap</i> del VAA-8 y del promotor P₁₀ en el vector pSR660.....	140
Anexo 3. Secuencia 301 gBlock.....	143
Anexo 4. Evaluación de la actividad de las enzimas KfII y Xcml	143
Anexo 5. Sitios de corte para proteasas dentro del inserto de 24 aa y proteasas codificadas por las células Sf9 y el baculovirus	145
Anexo 6. Cromatografía de exclusión estérica y cromatografía de afinidad para la purificación de cápsides de VAA-8.....	146
Anexo 7. Valores de resolución del mapa de densidad electrónica de la cápside modificada de VAA-8.....	152
Anexo 8. Absorbancias de los sueros preinmunes de los ratones empleados en los diseños experimentales de inmunización.....	152

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la partícula viral de un <i>Flavivirus</i> y organización de su genoma.	5
Figura 2. Transmisión de virus dengue y virus Zika en humanos.	6
Figura 3. Comparación entre la infección con virus dengue y virus Zika.	7
Figura 4. Infantes con tamaño típico de la cabeza y microcefalia moderada y severa asociada con la infección por virus Zika.	7
Figura 5. Distribución actual del riesgo de infección por virus dengue.	8
Figura 6. Distribución actual del riesgo de infección por virus Zika.	9
Figura 7. Plataformas empleadas para el desarrollo de vacunas contra virus dengue y virus Zika.	11
Figura 8. Infección con virus dengue y representación esquemática del fenómeno “potenciación de la infección mediada por anticuerpos”.	15
Figura 9. Evidencia de fenómeno “potenciación de la infección mediada por anticuerpos” entre serotipos de virus dengue, y entre virus dengue y virus Zika.	17
Figura 10. Dímero de la proteína E y epítomos de la proteína E identificados mediante anticuerpos monoclonales.	19
Figura 11. Tipos de epítomo, mimótopo, y la técnica de despliegue en fagos.	21
Figura 12. Alineamiento entre la secuencia de la proteína E de virus dengue del serotipo 2 o virus Zika y la secuencia del mimótopo.	22
Figura 13. Estructura y organización del genoma de virus adeno-asociado.	25
Figura 14. Generación de partículas pseudovirales de virus adeno-asociado que despliegan epítomos de virus del papiloma humano y detección de anticuerpos neutralizantes en ratones inmunizados.	29
Figura 15. Flujo de trabajo del método Bac-to-Bac para generar un baculovirus recombinante que codifique el gen cap de virus adeno-asociado (bacCap).	31
Figura 16. Flujo de trabajo del presente proyecto.	34

Figura 17. Línea de tiempo de la inmunización, refuerzos y sangrado para la colecta de suero del primer diseño experimental.	64
Figura 18. Línea de tiempo de la inmunización, refuerzos y sangrados para la colecta de suero del segundo diseño experimental.	64
Figura 19. Diseño de trabajo en la placa de 96 pozos para la determinación de los títulos de anticuerpo IgG anti-virus dengue del serotipo 2 o anti-virus Zika.	66
Figura 20. Patrón de restricción de pJET1.2/blunt más inserto 301 gBlock con la enzima PvuI.	68
Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del producto de la digestión de los plásmidos purificados de seis colonias candidatas a presentar la construcción pSR660M1, con la enzima de restricción PvuI.	69
Figura 22. Plásmido pSR660M1.	70
Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de la digestión del plásmido pSR660M1 extraído por segunda vez de la colonia 3, con la enzima de restricción PvuI.	71
Figura 24. Visualización de la posición de la inserción de los 72 pb dentro del marco de lectura del gen <i>cap</i> de virus adeno-asociado del serotipo 8.	72
Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los productos de PCR para verificar la presencia de la generación del bácmido recombinante.	73
Figura 26. Células Sf9 transfectadas con bácmidos recombinantes.	76
Figura 27. Western blot para la evaluación de la producción de baculovirus y la expresión de las proteínas VP1, VP2 y VP3 modificadas de virus adeno-asociado del serotipo 8.	78
Figura 28. Ensayo en placa para aislar poblaciones clonales de baculovirus bacCapMod.	81
Figura 29. Western blot con el anticuerpo monoclonal B1 para evaluar la expresión de las proteínas estructurales modificadas de virus adeno-asociado del serotipo 8, por las placas virales.	82
Figura 30. Dot blot con los anticuerpos monoclonales A20, ADK8 y EDE1-C8 para evaluar la presencia de cápsides en los clarificados de pellet	84

celular, y evaluar el despliegue del mimótopo del “epítipo 1 dependiente del dímero de la proteína E” de virus dengue y virus Zika.

Figura 31. Mapeo mediante Western blot de la proteólisis de las proteínas VPs modificadas de virus adeno-asociado del serotipo 8. 87

Figura 32. Gradiente de iodixanol empleado para purificar cápsides nativas de virus adeno-asociado del serotipo 8. 92

Figura 33. SDS-PAGE y Western blot para evaluación del proceso de purificación por gradiente de iodixanol de cápsides nativas de virus adeno-asociado del serotipo 8. 93

Figura 34. Dot blot con el anticuerpo monoclonal ADK8 para detectar ensamblados en las fracciones colectadas del proceso de purificación por gradiente de iodixanol de cápsides nativas de virus adeno-asociado del serotipo 8. 94

Figura 35. Micrografías de cápsides nativas purificadas de virus adeno-asociado del serotipo 8, obtenidas por microscopía electrónica de transmisión. 94

Figura 36. Gradientes de iodixanol empleados para evaluar la composición adecuada para obtener y purificar cápsides modificadas de virus adeno-asociado del serotipo 8, de acuerdo con la tabla 4. 95

Figura 37. SDS-PAGE y Western blot para evaluación del proceso de purificación por gradiente de iodixanol de cápsides modificadas de virus adeno-asociado del serotipo 8. 97

Figura 38. Micrografías de cápsides modificadas purificadas de virus adeno-asociado del serotipo 8, obtenidas por microscopía electrónica de transmisión. 99

Figura 39. Curva estándar para calcular la densidad de las partículas en la fracción I3. 100

Figura 40. Gradiente de iodixanol con proporciones de la variante “Nueva 2”. 101

Figura 41. Dot blot con los anticuerpos monoclonales ADK8 y EDE1-C8 para detectar cápsides en las muestras purificadas y concentradas, y 102

evaluar el despliegue del mimótopo del “epítipo 1 dependiente del dinero de la proteína E” de virus dengue y virus Zika.

Figura 42. Micrografías de ensamblados de virus adeno-asociado del serotipo 8 nativo y modificado, obtenidas por microscopía electrónica de transmisión.	103
Figura 43. Micrografía y mapa de densidad electrónica de virus adeno-asociado del serotipo 8 modificado, obtenidos por criomicroscopía electrónica.	104
Figura 44. Células C6/36 sin infectar e infectadas con virus dengue del serotipo 2 o virus Zika.	107
Figura 45. Dot blot con el anticuerpo monoclonal EDE1-C8 para detectar partículas de virus dengue y virus Zika.	108
Figura 46. Prueba de focos para determinación del título de virus dengue del serotipo 2 o virus Zika.	109
Figura 47. OD a 450 nm de las diluciones seriadas de sueros colectados a los 65 días post inmunización del primer diseño experimental.	111
Figura 48. Títulos de anticuerpos IgG de sueros colectados a los 65 días post inmunización del primer diseño experimental.	113
Figura 49. OD a 450 nm de las diluciones seriadas de sueros colectados a los 23 y 116 días post inmunización del segundo diseño experimental.	115
Figura 50. Títulos de anticuerpos IgG de sueros colectados a los 23 y 116 días post inmunización del segundo diseño experimental.	117
Figura A1. Plásmido pSR660.	139
Figura A2. Plásmido pJET1.2/blunt.	139
Figura A3. Verificación de la presencia del gen <i>cap</i> de virus adeno-asociado del serotipo 8, de su secuencia y de la secuencia del promotor P ₁₀ .	141
Figura A4. Fragmento 301 gBlock visualizado con SnapGene™ 1.1.3.	143
Figura A5. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del vector pSR660 digerido con XcmI y con KfII durante 3 horas.	144
Figura A6. Sitios de corte para proteasas identificados dentro del inserto de 24 aa.	145

Figura A7. Proteasas codificadas por el sistema células de insecto-baculovirus.	145
Figura A8. Cromatografía de exclusión estérica para la purificación de cápsides de virus adeno-asociado del serotipo 8.	147
Figura A9. Cromatografía de afinidad para la purificación de cápsides modificadas de virus adeno-asociado del serotipo 8.	150
Figura A10. Resolución del mapa de densidad electrónica de la cápside modificada de virus adeno-asociado del serotipo 8, según diferentes máscaras.	152
Figura A11. OD a 450 nm de las diluciones seriadas de sueros preinmunes de ratones del primer diseño experimental.	152
Figura A12. OD a 450 nm de las diluciones seriadas de sueros preinmunes de ratones del segundo diseño experimental.	153

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para la amplificación del fragmento 301 gBlock y longitud de amplicón esperado.	39
Tabla 2. Oligonucleótidos usados para verificar la construcción del vector pSR660M1 mediante secuenciación.	40
Tabla 3. Oligonucleótidos usados para verificar la presencia del inserto de interés en el bácmido, amplicones esperados, temperaturas de hibridación y tiempos de extensión.	43
Tabla 4. Variantes en las proporciones de iodixanol empleadas para el gradiente discontinuo en la purificación de las cápsides modificadas de virus adeno-asociado del serotipo 8.	55
Tabla 5. Primer diseño experimental de inmunización de ratones BALB/c.	63
Tabla 6. Segundo diseño experimental de inmunización de ratones BALB/c.	63
Tabla 7. Títulos de los stocks de baculovirus recombinantes.	83
Tabla 8. Títulos de los stocks de virus dengue del serotipo 2 y virus Zika.	110
Tabla 9. Títulos de anticuerpos IgG anti-virus dengue del serotipo 2 de sueros colectados a los 65 días post inmunización del primer diseño experimental.	112
Tabla 10. Títulos de anticuerpos IgG anti-virus Zika de sueros colectados a los 65 días post inmunización del primer diseño experimental.	112
Tabla 11. Títulos de anticuerpos IgG anti-virus dengue del serotipo 2 de sueros colectados a los 23 días post inmunización del segundo diseño experimental.	116
Tabla 12. Títulos de anticuerpos IgG anti-virus dengue del serotipo 2 de sueros colectados a los 116 días post inmunización del segundo diseño experimental.	116
Tabla 13. Títulos de anticuerpos IgG anti-virus Zika de sueros colectados a los 23 días post inmunización del segundo diseño experimental.	116
Tabla 14. Títulos de anticuerpos IgG anti-virus Zika de sueros colectados a los 116 días post inmunización del segundo diseño experimental.	117

Tabla A1. Oligonucleótidos mandados a sintetizar para verificar la secuencia del gen *cap* de virus adeno-asociado del serotipo 8 y del promotor P₁₀ dentro del vector pSR660. 140

Tabla A2. Temperaturas de hibridación evaluadas de los oligonucleótidos empleados en la PCR para la verificación de la secuencia del gen *cap* de virus adeno-asociado del serotipo 8 y del promotor P₁₀. 141

ABREVIATURAS

AcM	Anticuerpo monoclonal
AcMNPV	Poliedrovirus nuclear múltiple de <i>Autographa californica</i>
ADE	Antibody-dependent enhancement
AIF	Adyuvante incompleto de Freund
bacCap	Baculovirus recombinante con el gen <i>cap</i> del VAA
bacCapMod	Baculovirus recombinante con el gen <i>cap</i> modificado del VAA
bacRep Cap 2/8	Baculovirus recombinante con el gen <i>rep</i> del VAA-2 y el gen <i>cap</i> del VAA-8
crioME	Criomicroscopía electrónica
DenV	Virus dengue
DenV-2	Virus dengue del serotipo 2
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's médium
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dpi	Días post inmunización
EDE	Epítopo dependiente del dímero de la proteína E
EDE1	Epítopo 1 dependiente del dímero de la proteína E
eGFP	Proteína fluorescente verde mejorada
EMEM	Eagle's minimum essential medium
hpi	Horas post infección
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
ITR	Repeticiones terminales invertidas
kb	Kilobases

kDa	Kilodaltones
kg	Kilogramo
L	Litro
LB	Medio Luria Bertani
M	Molar
MDI	Multiplicidad de infección
MET	Microscopía electrónica de transmisión
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MTT	Bromuro de 3-(4,6-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio
NaCl	Cloruro de sodio
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases
PBS	Buffer de fosfatos
PBS-MK	Buffer de fosfatos con MgCl ₂ y KCl
PBST	Buffer de fosfatos con Tween 20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG-6000	Polietilenglicol-6000
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PPV	Partículas pseudovirales
RFP	Proteína fluorescente roja
rpm	Revoluciones por minuto

SCI-BV	Sistema células de insecto-Baculovirus
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
SGB	Síndrome Guillain-Barré
SOC	Medio súper óptimo con represión catabólica
TBS	Buffer de Tris-HCl y NaCl
TBST	Buffer de Tris-HCl y NaCl con Tween 20
TCID50/mL	Dosis de infección media
TCLD50/mL	Dosis letal media para cultivo celular
T _m	Temperatura de fusión
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbencidina
UFF	Unidades formadoras de focos
UFP	Unidades formadoras de placa
VAA	Virus adeno-asociado
VAA-2	Virus adeno-asociado del serotipo 2
VAA-8	Virus adeno-asociado del serotipo 8
VPs	Proteínas estructurales de VAA
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido
ZikV	Virus Zika
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μm	Micrómetros

RESUMEN

La inmunidad preexistente a virus dengue (DenV) es un factor de riesgo de dengue severo. Anticuerpos dirigidos contra algunos epítomos de un serotipo de DenV pueden unirse a un DenV de otro serotipo sin neutralizarlo y facilitar su ingreso a células e incrementar la severidad de una infección, fenómeno conocido como “potenciación de la infección mediada por anticuerpos” (ADE). Por el contrario, algunos epítomos pueden inducir anticuerpos neutralizantes de amplio espectro para los cuatro serotipos de DenV. Esta inmunidad preexistente también es un factor de riesgo para infecciones por virus Zika (ZikV), un miembro del mismo género al que pertenece DenV. Por lo tanto, es importante seleccionar epítomos específicos de estos virus para desarrollar una vacuna que no esté vinculada al fenómeno ADE. En el presente estudio, se desarrolló un candidato a vacuna dual contra DenV y ZikV que está diseñado para no inducir ADE. Anteriormente, se identificó un péptido que mimetiza al “epítomo 1 dependiente del dímero de la proteína E” (EDE1), es decir, un mimótopo. El epítomo EDE1 está conservado en DenV y ZikV, y anticuerpos dirigidos contra este son capaces de neutralizar a ambos virus sin causar ADE. En el presente trabajo, el mimótopo fue desplegado en partículas pseudovirales (PPV) o cápsides vacías de virus adeno-asociado del serotipo 8 (VAA-8) mediante fusión genética. Las proteínas y partículas quiméricas fueron caracterizadas mediante Western blot, Dot blot, microscopía electrónica de transmisión y criomicroscopía electrónica, mostrando que son reconocidas por un anticuerpo monoclonal específico de DenV y ZikV, y no de VAA-8, y que las proteínas quiméricas se ensamblaron con morfología típica de la cápside de VAA-8. Grupos de ratones BALB/c se inmunizaron por vía subcutánea o intramuscular con las cápsides modificadas, cápsides nativas o controles. Los ratones inmunizados con cápsides modificadas produjeron anticuerpos que reconocieron a DenV del serotipo 2 y a ZikV. Por lo tanto, este trabajo constituye el diseño y la evaluación *in vivo* en ratones de un candidato para una vacuna contra ambos virus. Además, se demostró por primera vez la posibilidad de presentar péptidos inmunogénicos en PPV de VAA-8.

1. INTRODUCCIÓN

Los virus dengue (DenV) y Zika (ZikV) son miembros del género *Flavivirus* y son transmitidos a seres humanos principalmente por picaduras de mosquitos *Aedes aegypti* infectados con estos virus. En el caso de ZikV, otra vía importante de transmisión es la sexual (Wen y Shrestha, 2019).

La mayoría de las infecciones por DenV y ZikV son asintomáticas o causan una enfermedad leve, pero en algunos casos estas infecciones pueden conllevar a manifestaciones hemorrágicas por dengue severo, o microcefalia o síndrome de Guillain-Barré (SGB) por ZikV, las cuales pueden dejar graves consecuencias e incluso causar la muerte (Wen y Shrestha, 2019; Ngono y Shrestha, 2018).

La manera más efectiva de evitar la severidad de una infección por DenV y/o ZikV es a través de la vacunación, la cual es la administración de una preparación biológica o biotecnológica (vacuna) que induce una respuesta de defensa frente a un patógeno determinado (Donnelly, 2017; Chen *et al.*, 2017). Actualmente la única vacuna aprobada contra DenV (DengVaxia) para su uso en humanos presenta problemas de seguridad y eficacia (Redoni *et al.*, 2020); y en el caso de ZikV, aún no hay alguna vacuna con licencia para uso en humanos (Poland *et al.*, 2019). Asimismo, no existen fármacos o tratamientos eficaces ante una infección con estos dos *Flavivirus* (Redoni *et al.*, 2020; Poland *et al.*, 2019).

Al desarrollar una vacuna contra DenV y/o ZikV, se debe tener presente el fenómeno llamado “potenciación de la infección mediada por anticuerpos” (*antibody-dependent enhancement*) (ADE), el cual, en el caso de DenV, se puede producir cuando un paciente seropositivo a DenV se vuelve a infectar, pero esta vez con un serotipo distinto de DenV (Rey *et al.*, 2018). Los anticuerpos existentes en títulos bajos o con baja afinidad por el segundo virus facilitan la entrada de complejos de virus no neutralizados con anticuerpos a las células fagocíticas que poseen receptores Fcγ, aumentando la carga viral y desencadenando un cuadro de dengue severo (Wen y Shrestha, 2019). DenV y ZikV presentan un alto grado de similitud de secuencia y de estructura, y el fenómeno ADE ha sido reportado entre ellos (Rey *et al.*, 2018; Langerak *et al.*, 2019). A causa de que DenV y ZikV cocirculan en algunas

regiones del mundo, se necesita una vacuna que proporcione protección contra ambos virus sin inducir ADE.

En la actualidad, existen alrededor de 80 registros de evaluación de ensayos clínicos de candidatos vacunales contra DenV, y para ZikV, existen al menos 16 registros; sin embargo, menos del 30% contemplan explícitamente evitar el ADE o ser candidatos vacunales duales (Sun *et al.*, 2020; Thomas y Barrett, 2020; WHO, 2020).

El epítipo conformacional “epítipo 1 dependiente del dímero de la proteína E” (EDE1), el cual está conservado entre DenV y ZikV, fue descubierto por Dejnirattisai *et al.* (2015); posteriormente, Barba-Spaeth *et al.* (2016) vincularon este epítipo a la inducción de anticuerpos neutralizantes contra ambos *Flavivirus* sin causar el fenómeno ADE. En nuestro grupo de investigación, en el Instituto de Biotecnología (IBt) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), se descubrió un péptido que mimetiza al epítipo EDE1, es decir, un mimótopo. Este mimótopo es una excelente opción para desarrollar un candidato a vacuna dual contra ambos *Flavivirus*. No obstante, las estructuras de los péptidos suelen ser inestables o pueden perderse al ingresar en el torrente sanguíneo (Böttger *et al.*, 2017) y por sí solos resultan ser poco inmunogénicos (O’Rourke *et al.*, 2014). Una estrategia para aumentar la estabilidad e incrementar la inmunogenicidad de estos péptidos es su despliegue en partículas pseudovirales (PPV) (O’Rourke *et al.*, 2014), como las formadas por proteínas de virus adeno-asociado (VAA) (Nieto *et al.*, 2012, Singer *et al.*, 2016).

De lo expuesto, el presente trabajo se centró en desplegar el mimótopo del epítipo común entre DenV y ZikV en cápsidas vacías recombinantes de VAA del serotipo 8 (VAA-8), es decir, en PPV de VAA-8; y evaluar su potencial como candidato a vacuna dual contra DenV y ZikV en ratones BALB/c.

2. ANTECEDENTES

2.1. Virus dengue (DenV) y virus Zika (ZikV)

2.1.1. Virología

DenV está clasificado en cuatro serotipos (DenV-1, DenV-2, DenV-3 y DenV-4), y ZikV, en un solo serotipo. Ambos virus pertenecen al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* (Wen y Shresta, 2019). Los *Flavivirus* son virus envueltos de simetría icosaédrica y de forma esférica (Thomas *et al.*, 2014; Paixão *et al.*, 2017). Estos virus están formados por una nucleocápside compuesta de un genoma de RNA de cadena sencilla, sentido positivo y tamaño aproximado de 11 kb, y de múltiples copias de la proteína de la cápside (C). La nucleocápside está rodeada por la bicapa lipídica derivada de la membrana celular del hospedero. Esta bicapa tiene integrada 180 copias de la glicoproteína viral de envoltura (E), y 180 copias de la proteína precursora de membrana (prM) en la partícula viral inmadura (60 nm de diámetro) o de la proteína de membrana (M, un producto de la proteólisis de la proteína prM) en la partícula viral madura (50 nm de diámetro) (Figura 1A) (Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Kostyuchenko *et al.*, 2016; Perera y Kuhn, 2008; Heinz y Stiasny, 2017).

El genoma de los *Flavivirus* posee un solo marco abierto de lectura que está flanqueado por regiones no traducidas 5' y 3'. Este genoma codifica para una poliproteína precursora, la cual es procesada durante y después de la traducción mediante proteólisis, esto resulta en la generación de las proteínas estructurales C, prM y E, y las proteínas no estructurales NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, y NS5 (Figura 1B) (Norazharuddin y Lai, 2018; Rey *et al.*, 2018). El N-terminal de las proteínas prM, E, NS1 y NS4B es producido en el retículo endoplasmático (RE) de la célula hospedera mediante peptidasas de péptido señal del RE, el resto de las proteínas no estructurales y el C-terminal de la proteína C son producidos en el citoplasma del hospedero por la proteasa viral NS2B-NS3; y, por último, la proteína M es producida a partir de la proteína prM mediante acción de la proteasa furina en el aparato de Golgi (Norazharuddin y Lai, 2018). Las proteínas estructurales están involucradas en funciones de entrada a la célula, fusión con membranas y ensamblaje de las partículas virales. Las proteínas no estructurales presentan

funciones de helicasa, proteasa, RNA polimerasa dependiente de RNA, y otras que están principalmente involucradas en el proceso de replicación viral, la síntesis de RNA viral, ensamblaje del virión y la regulación de las respuestas de la célula huésped (Norazharuddin y Lai, 2018; Ávila-Pérez *et al.*, 2018; Perera y Kuhn, 2008).

Durante el ensamblaje de partículas virales dentro de la célula infectada, las partículas de *Flavivirus* como DenV y ZikV atraviesan por un proceso de maduración para adquirir su capacidad infecciosa. Al inicio, ambas proteínas se encuentran formando heterodímeros prM/E, y estos a su vez, forman en total 60 trímeros ($60 \times (\text{prM/E})_3$) que le dan una apariencia puntiaguda a la envoltura viral. Posteriormente, estas partículas sufren un cambio conformacional reversible y los 60 trímeros de heterodímeros prM/E se convierten en 90 dímeros de heterodímeros prM/E ($90 \times (\text{prM/E})_2$), los cuales ya presentan el arreglo característico de los dímeros de proteína E presentes en las partículas virales maduras. Por último, al pasar de trímeros a dímeros de prM/E, la proteína prM expone el sitio de corte proteolítico para furina, la cual provoca un cambio conformacional irreversible que induce la formación 90 homodímeros de la proteína M y 90 homodímeros de la proteína E, lo cual resulta en partículas virales maduras (Rey *et al.*, 2018). Debido a que el proceso de maduración es ineficiente, no todas las partículas virales ensambladas que se liberan de las células son maduras, éstas coexisten con partículas inmaduras, y partículas parcialmente inmaduras o mosaicos. Las partículas inmaduras no fueron proteolizadas por la enzima furina, mientras que los mosaicos se generan por un procesamiento de maduración incompleto, en el que la furina no corta todas las proteínas prM presentes en la superficie de la partícula viral inmadura (Rey *et al.*, 2018). Las partículas con capacidad infecciosa son las maduras y las parcialmente inmaduras, mientras que las inmaduras normalmente no tienen esa capacidad; sin embargo, pueden volverse infecciosas si son endocitadas y la furina del endosoma corta a la proteína prM (Rey *et al.*, 2018; Wirawan *et al.*, 2019; Richter *et al.*, 2014).

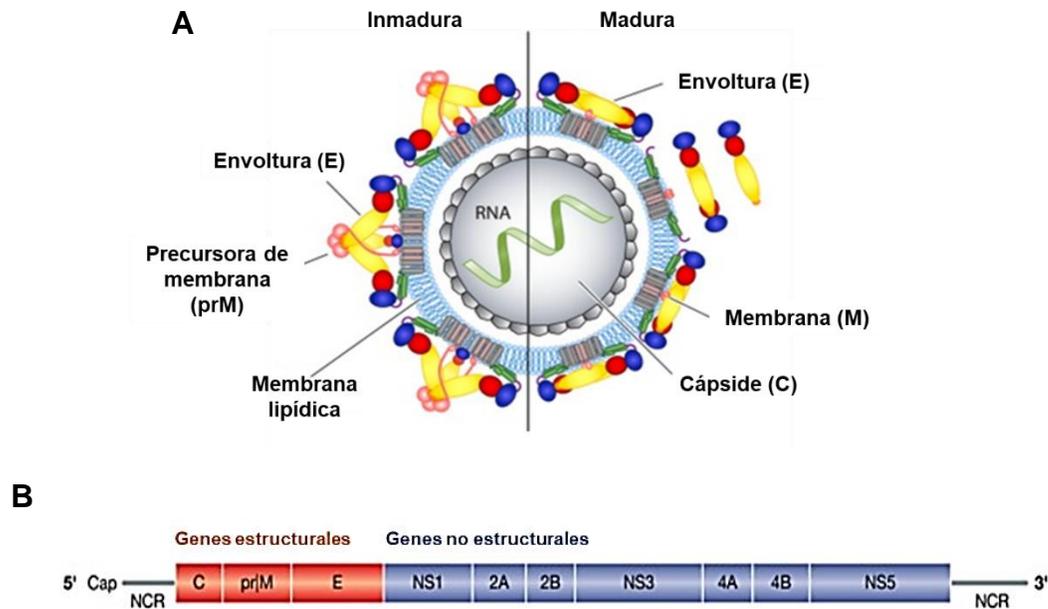


Figura 1. Estructura de la partícula viral de un *Flavivirus* y organización de su genoma. (A) Representación esquemática de la estructura de las partículas virales inmaduras y maduras de un *Flavivirus* como DenV y ZikV. (B) organización genómica mostrando a las regiones que codifican para las proteínas estructurales y no estructurales de un *Flavivirus* (adaptado de Heinz y Stiasny, 2017; Rey *et al.*, 2018).

2.1.2. Transmisión

DenV y ZikV se transmiten a humanos principalmente a través de picaduras de mosquitos (arbovirus) del género *Aedes* infectados, siendo *Aedes aegypti* el principal vector (Suwanmanee y Luplertlop, 2017). Dentro de las vías alternativas de transmisión, DenV puede transmitirse a través de transfusiones sanguíneas, trasplantes de órganos como hígado, además existe la posibilidad de transmisión vertical o perinatal (periodo de gestación, parto y exposición a leche materna) cuando la madre se infecta cerca a la fecha de nacimiento (Chen y Wilson, 2016). En el caso de ZikV, este también se puede transmitir de manera vertical de mujeres embarazadas infectadas hacia el feto, y de manera horizontal a través de transfusión sanguínea; y a diferencia de DenV, también se puede transmitir sexualmente (Figura 2) (Colt *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2017).

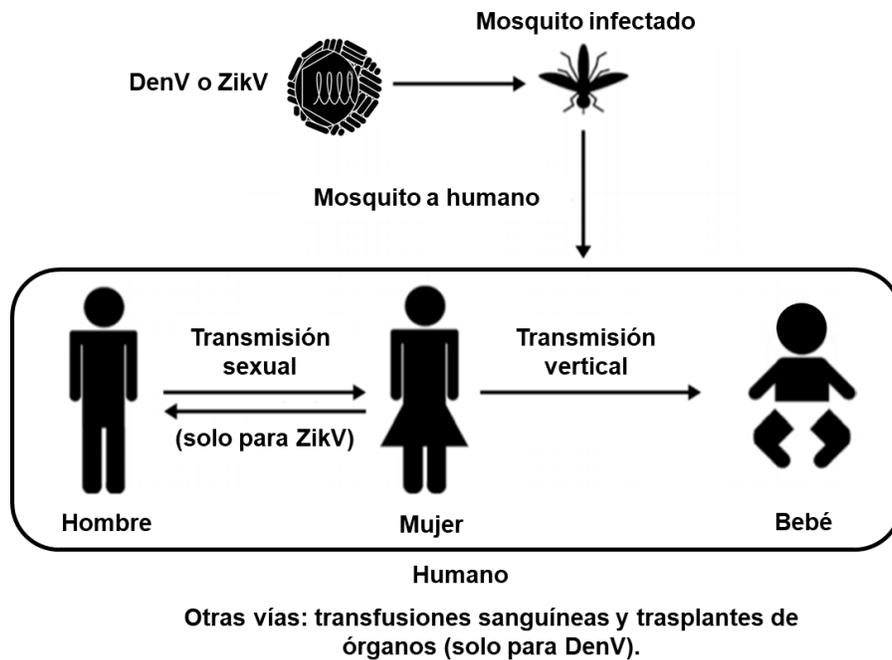


Figura 2. Transmisión de virus dengue y virus Zika en humanos (modificado de Dénes *et al.*, 2019).

2.1.3. Infección

Las infecciones con DenV son asintomáticas hasta en el 75% de humanos infectados y una fracción pequeña (0.5% - 5%) de casos progresa hasta dengue severo (Schaefer *et al.*, 2020). De manera similar, las infecciones con ZikV son sintomáticas solo en el 20-25% de individuos infectados (Song *et al.*, 2017).

Las infecciones con DenV o ZikV pueden provocar síntomas similares (Figura 3) de fiebre, dolor retroocular (dengue)/conjuntivitis (Zika), erupciones cutáneas, dolor muscular, dolor en articulaciones y dolor de cabeza. Por otro lado, se pueden presentar manifestaciones graves por dengue severo como fiebre hemorrágica y síndrome de choque; y, el SGB en adultos y malformaciones congénitas en fetos, incluyendo microcefalia (Figura 4), en el caso de ZikV (Suwanmanee y Luplertlop, 2017). En el caso de infecciones por ZikV, incluso los casos asintomáticos pueden presentar microcefalia o SGB (Lessler *et al.*, 2016).

Desde el punto de vista patológico, DenV es catalogado como un virus hemorrágico, mientras que ZikV como un virus neurotrópico (Suwanmanee y Luplertlop, 2017). La fiebre hemorrágica por dengue se caracteriza por pérdida grave de plasma,

hemorragia, disfunción orgánica, alteración del conocimiento, disfunción del miocardio y disfunción pulmonar; mientras que el síndrome de choque por dengue incluye aumento rápido del hematocrito, dolor abdominal intenso, vómitos persistentes y poca o nula presión sanguínea (Schaefer *et al.*, 2020). La microcefalia es un trastorno del desarrollo neurológico, que se caracteriza por una reducción marcada en el tamaño del cerebro y el tamaño de la cabeza, esto produce discapacidad intelectual causada por daño en la proliferación celular, y la muerte de las células progenitoras corticales y su progenie neural (Wen *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2017). El SGB es una enfermedad inflamatoria y autoinmune, en la cual el sistema inmune ataca parte del sistema nervioso periférico causando entumecimiento, debilidad muscular, parálisis ascendente e incluso la muerte (Lin *et al.*, 2018).

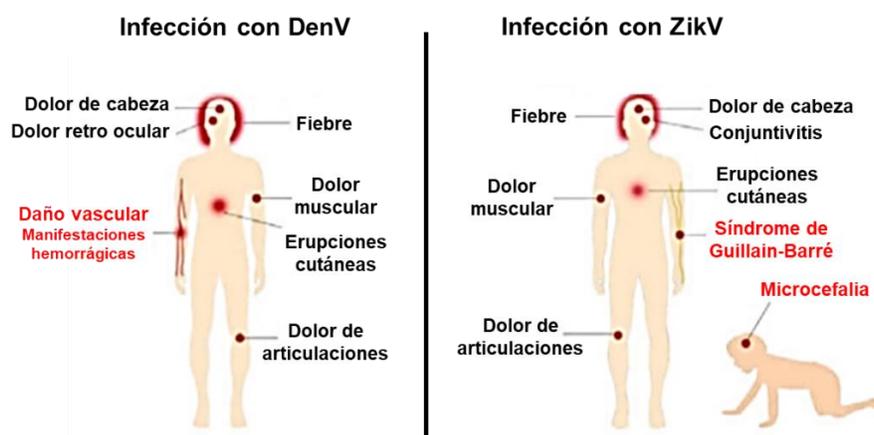


Figura 3. Comparación entre la infección con virus dengue y virus Zika (modificado de Suwanmanee y Luplertlop, 2017).



Figura 4. Infantes con tamaño típico de la cabeza y microcefalia moderada y severa asociada con la infección por virus Zika (tomado de NCBDDD-CDC, 2016).

2.1.4. Distribución

DenV fue descubierto en 1943 y desde entonces las infecciones por este virus se han incrementado principalmente en áreas tropicales y subtropicales del mundo. La infección con este virus se considera de interés mundial, ya que se reportan más de 390 millones de casos totales, 500 mil casos severos de dengue y 20 mil casos de muerte por dengue al año (Suwanmanee y Luplertlop, 2017). Es endémico en más de 100 países y actualmente (año 2020) se están reportando un gran número de brotes en territorios tropicales y países cercanos a estos como Brasil, México, Perú, India, Singapur, Estados Unidos, entre otros (CDC, 2020). La distribución actual del riesgo de infección por DenV se muestra en la figura 5.

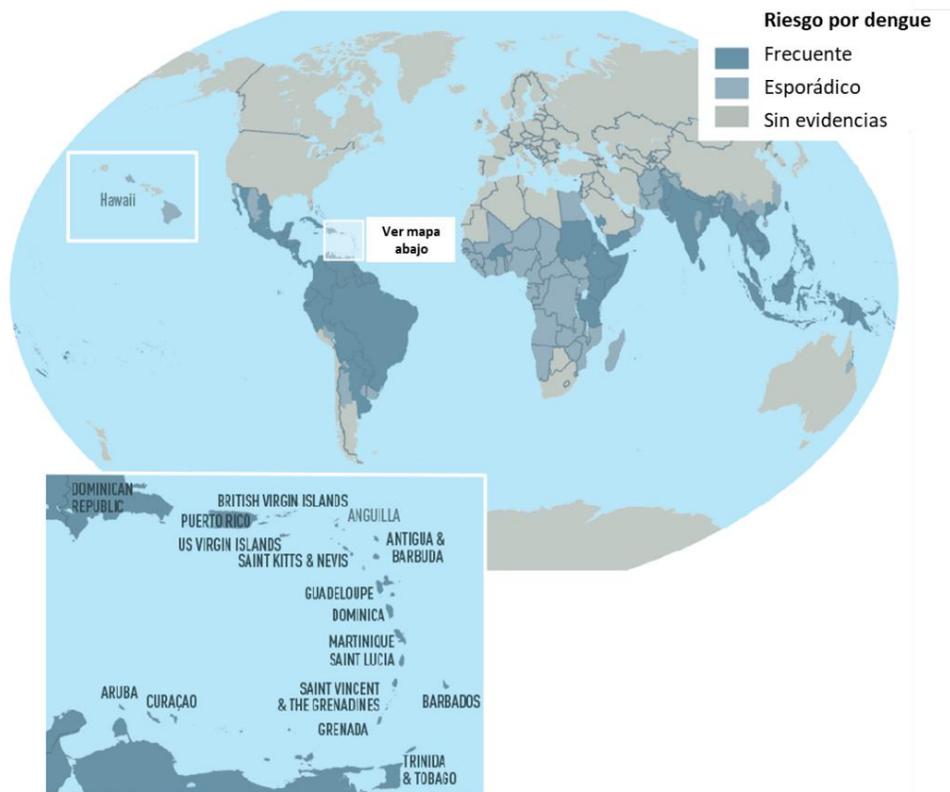
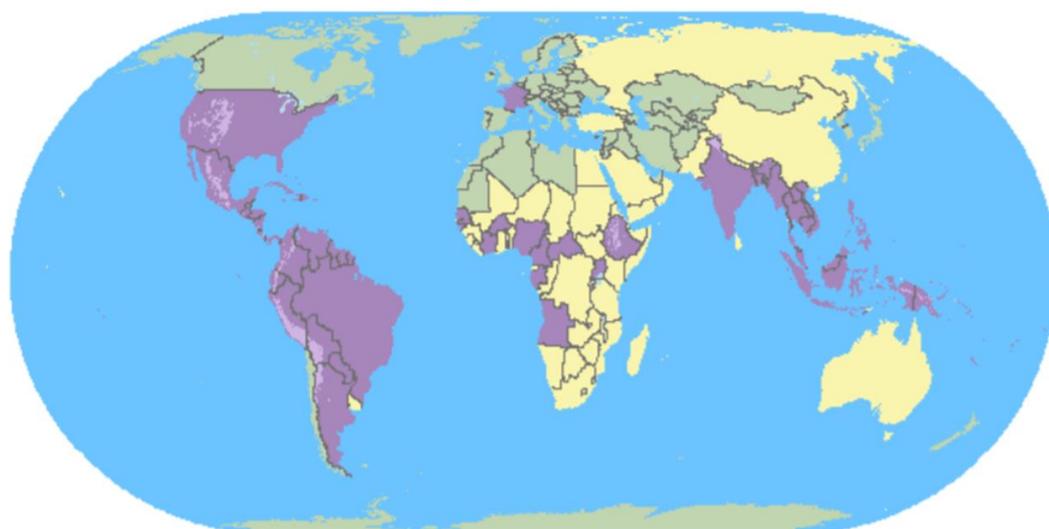


Figura 5. Distribución actual del riesgo de infección por virus dengue (adaptado de CDC, 2020).

Por otro lado, ZikV fue aislado por primera vez en 1947 de un mono Rhesus capturado en el bosque Zika, Uganda. En 2007, ocurrió la primera epidemia grande por este virus fuera de África y Asia, en Micronesia; pero no hubo muertes ni

hospitalizaciones (Suwanmanee y Luplertlop, 2017). En febrero del 2016, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró a la infección por ZikV como una emergencia de salud pública de interés internacional debido a su rápida propagación en las Américas desde el 2015 y a los casos de microcefalia vinculados a este virus (McNeil y Shetty, 2017; McCloskey y Endericks, 2017). Alrededor del año 2016, se confirmaron más de 100 mil casos de infección por ZikV y alrededor de 2000 casos de síndrome congénito por ZikV (McNeil y Shetty, 2017). Desde noviembre del año 2016, la infección por ZikV ya no es considerada una emergencia internacional, pero el cambio en la designación no significa una disminución de su importancia, ya que podrían ocurrir nuevas epidemias con consecuencias graves (Garg *et al.*, 2018). Actualmente, no se reportan brotes de ZikV, pero existen más de 90 países/territorios, a nivel mundial, con riesgo de infección por ZikV, incluyendo México. La distribución actual del riesgo se muestra en la figura 6 (CDC, 2019).



Leyenda

- País o territorio con brotes actuales de Zika¹
 - País o territorio que ha reportado casos de Zika² (pasado o actual)
 - Áreas con baja probabilidad de infección con Zika debido a su alta elevación (sobre los 2000 metros)
 - País o territorio con mosquito vector³, pero no ha reportado casos de Zika²
 - País o territorio sin mosquito vector³ que propagan el Zika
- ¹ Actualmente no hay áreas reportando brotes de Zika
² Localmente adquirido, casos de Zika transmitidos por mosquitos
³ *Aedes aegypti*

Figura 6. Distribución actual del riesgo de infección por virus Zika (adaptado de CDC, 2019).

DenV y ZikV cocirculan en algunos países o regiones, esto se debe a que *A. aegypti* es el vector principal de ambos y se encuentra ampliamente distribuido alrededor del mundo (Sun *et al.*, 2020; Langerak *et al.*, 2019).

2.2. Desarrollo de vacunas

2.2.1. Definición y plataformas de vacuna

Una vacuna es una preparación biológica o biotecnológica que al administrarse mejora la respuesta de defensa frente a un patógeno determinado (Donnelly, 2017; Chen *et al.*, 2017). El componente principal de una vacuna es el antígeno, el cual es una parte de un patógeno. Este antígeno es reconocido por el sistema inmune como extraño a nuestro organismo, principalmente al unirse e interaccionar con anticuerpos o receptores de linfocitos B y T. La parte del antígeno que es reconocido por elementos del sistema inmune se denomina epítopo y cuando un antígeno es capaz de inducir una respuesta inmune se denomina inmunógeno. La finalidad de las vacunas es inducir respuestas inmunes protectoras mediante la administración de inmunógenos (Fishman *et al.*, 2015; Van Regenmortel, 2008).

Existen distintas plataformas o tipos de vacunas, como las de virus vivos atenuados (VVA) y virus inactivados (VI), las cuales son vacunas de virus completos (vacunas tradicionales); las vacunas de proteínas recombinantes (PR) o péptidos sintéticos y partículas pseudovirales (PPV), las cuales pertenecen al grupo de vacunas de subunidades; y como las vacunas de DNA, RNA mensajero (RNAm), y los vectores virales (VV) replicantes y no replicantes, los cuales pertenecen al grupo de vacunas de ácidos nucleicos (Thisyakorn y Tantawichien, 2020; Garg *et al.*, 2018; NIAID-NIH, 2019) (Figura 7).

Las vacunas de VVA se generan por pases sucesivos en animales o cultivos celulares hasta obtener mutantes con menor capacidad de causar enfermedad, también se pueden obtener mediante ingeniería genética al inducir mutaciones dirigidas, al mezclar genomas de diferentes virus (quimeras) o al someter al virus a condiciones mutagénicas (Burrell *et al.*, 2017; Callaway, 2020; Pierson y Diamond, 2018). Las vacunas de VI se generan por exposición del virus vacunal a agentes

químicos como el formaldehído o a agentes físicos como el calor o la radiación (Burrell *et al.*, 2017; Callaway, 2020; Delrue *et al.*, 2012). Las vacunas de subunidades (PR y PPV) contienen solamente las partes relevantes de un virus para inducir las respuestas protectoras deseables (Vartak y Sucheck, 2016) y son obtenidas en su mayoría mediante la tecnología del DNA recombinante (Calina *et al.*, 2020). Las vacunas de DNA y RNAm se obtienen por clonación de la secuencia del gen que codifica para el antígeno en un vector plasmídico (Chen *et al.*, 2017; Pandey *et al.*, 2020); y, además, para las de RNAm, el plásmido es linealizado y es transcrito (Versteeg *et al.*, 2019). Las vacunas de vectores virales se generan por la inserción de la secuencia del gen del antígeno de un virus de interés dentro del genoma de otro virus, y este último puede o no puede tener los elementos necesarios para su replicación; (Rauch *et al.*, 2018; Calina *et al.*, 2020; Shang *et al.*, 2020; Mak y Saunders, 2006).

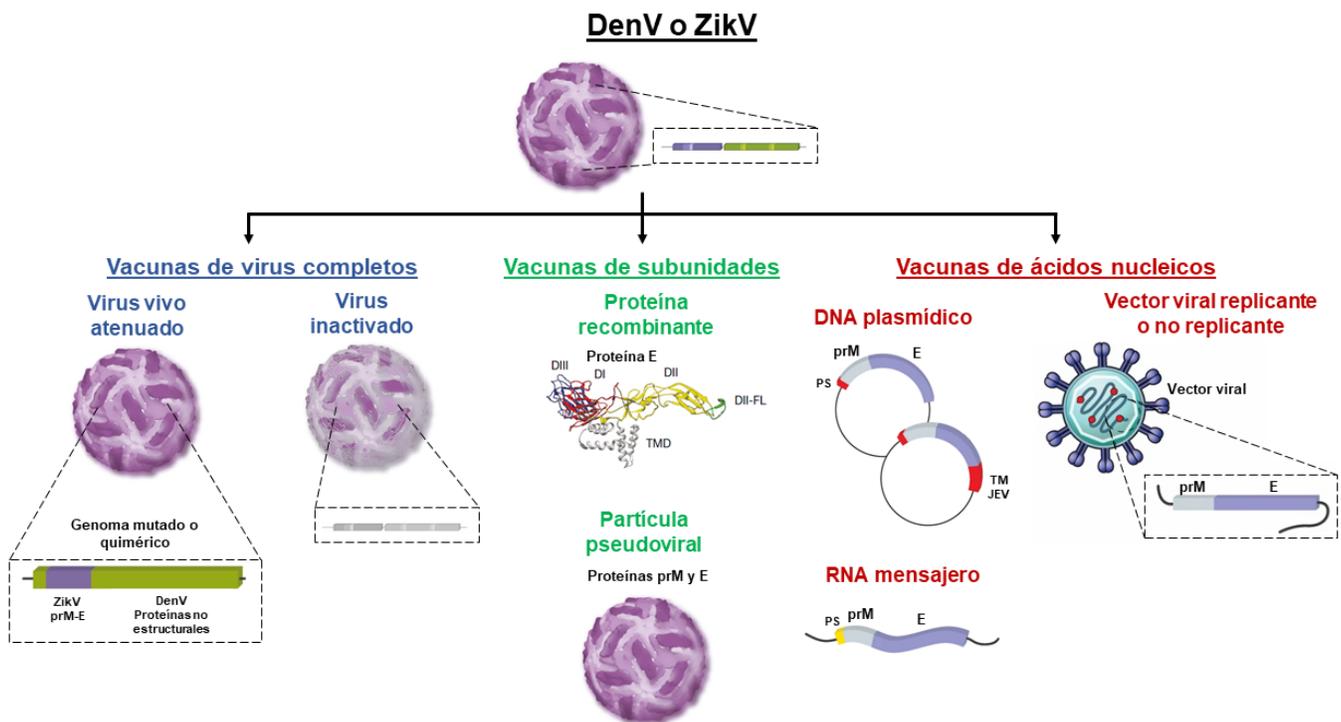


Figura 7. Plataformas empleadas para el desarrollo de vacunas contra virus dengue y virus Zika. prM: proteína precursora de la membrana; E: proteína de la envoltura; DI, DII y DIII: dominios I, II y III de la proteína de envoltura; DII-FL: bucle de fusión en DII; TM: dominio transmembrana de la proteína de envoltura; PS: péptido señal; JEV: virus de la encefalitis japonesa (modificado de Pierson y Diamond, 2018).

2.2.2. Vacunas candidatas contra DenV y ZikV

Actualmente, existe una vacuna contra DenV aprobada para su uso en humanos desde el 2015, Dengvaxia (fabricada por Sanofi-Pasteur), la cual está basada en la plataforma de VVA quiméricos. Esta vacuna está formulada con cuatro VVA diferentes (tetraivalente), los cuales poseen genomas que contienen todos los genes del virus de la fiebre amarilla, pero se les reemplazaron los genes de las proteínas prM y E por los correspondientes de cada serotipo de DenV (Thomas y Yoon, 2019; Redoni *et al.*, 2020). Sin embargo, esta vacuna presenta problemas de eficacia, 44.6% en niños menos de nueve años y 67.8% en adultos; y seguridad, debido a que niños menores de nueve años presentan riesgo de complicaciones asociadas a Dengvaxia, y en individuos sin infección previa por DenV, la vacuna puede actuar como una primera infección y ponerlos en riesgo durante una segunda infección, la cual está asociada con dengue severo (Redoni *et al.*, 2020). En el caso de ZikV, no existe vacuna licenciada para su uso en humanos (Poland *et al.*, 2019).

En la actualidad, varios candidatos vacunales contra DenV y ZikV están en ensayos de evaluación preclínica (en animales) y clínica (en humanos) (Sun *et al.*, 2020). Hasta el 09 de agosto del 2020, de los ensayos en humanos, existen 37 estudios registrados en fase I para evaluación de candidatos vacunales contra DenV, 29 en fase II y 14 en fase III, los cuales están basados en plataformas de VVA, VI, PR, vacunas de DNA y VV (WHO, 2020). Entre los candidatos a vacuna contra ZikV, hay 15 estudios registrados en fase I y uno en fase 2, y las plataformas en evaluación son las de VI, péptidos, vacunas de DNA, vacunas de RNAm y VV (WHO, 2020; Thomas y Barrett, 2020).

Entre los candidatos vacunales en estudios de evaluación más avanzados (fase III) contra DenV, se encuentran TDV o DENVax o TAK-003 (fabricada por Takeda), y TV003/TV005 o LAVΔ30 o TetraVax-DV (fabricada por NIH y Butantan). Ambos candidatos emplean la plataforma de VVA (Redoni *et al.*, 2020; Thisyakorn y Tantawichien, 2020). El candidato TDV se basa en el genoma atenuado de DenV-2 de la cepa PDK53, al cual se le reemplazó las secuencias de las proteínas prM y E por las de DenV-1, DenV-3 y DenV-4 para finalmente obtener una formulación tetraivalente conformada por un VVA de DenV-2, y tres VVA quiméricos

pertencientes a los otros tres serotipos de DenV y DenV-2. En las evaluaciones de fase I y fase II participaron 96 y 148 voluntarios sin infección previa por DenV, respectivamente. El candidato generó efectos adversos leves, indujo seroconversión para los cuatro serotipos en el 62% de los casos y para tres o más serotipos en el 96% de los casos, con la respuesta inmune más alta para DenV-2 y la más baja para DenV-4. En noviembre del 2019, se publicaron los resultados de la primera parte de la fase III, se obtuvo 80.2% de eficacia total, 95.4% de eficacia en la prevención de dengue severo y 74.9% de eficacia en individuos seronegativos. Este candidato sigue en evaluación y se esperan nuevos resultados para el 2021. Por otra parte, el candidato TV003/TV005 fue evaluado en fases I y II, y también indujo efectos adversos leves y la seroconversión contra todos los serotipos fue 74%, mientras que para tres de los serotipos fue del 92%. Se espera obtener los resultados de la fase III en el 2025 (Redoni *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2020). Y para ZikV, el candidato más avanzado (fase II), VRC5283 (fabricado por NIAID), se basa en un DNA que codifica a los genes prM y E de ZikV; este candidato al expresarse *in vivo* puede formar PPV. Los resultados de la fase I de VRC5283 mostraron que los 45 individuos evaluados presentaron seroconversión (100%), se indujeron altos valores de anticuerpos neutralizantes, y respuestas inmunes eficaces de células T (Sun *et al.*, 2020).

2.3. Fenómeno ADE y vacuna dual contra DenV y ZikV

2.3.1. Fenómeno ADE en DenV y ZikV

Cuando un individuo se infecta con DenV, en su organismo coexisten partículas virales maduras, inmaduras y mosaicos. Durante la respuesta inmune contra la infección se producen anticuerpos contra los distintos epítomos de las partículas virales, incluyendo anticuerpos que reconocen solamente zonas inmaduras (epítomos crípticos) y anticuerpos que reconocen solo zonas maduras de las partículas virales (Rey *et al.*, 2018). Además de los anticuerpos específicos contra el serotipo que infectó, se pueden producir anticuerpos de amplio espectro o reactividad cruzada que pueden reconocer epítomos conservados presentes en los

cuatro serotipos de DenV, los cuales presentan similitud de 69% a 72% en sus poliproteínas (Sun *et al.*, 2020; Rey *et al.*, 2018). Algunos de estos anticuerpos neutralizan (anticuerpos neutralizantes) el ingreso y la replicación del virus en la célula blanco, al interferir con las interacciones virus-receptor celular o con la fusión entre las membranas del virus y del endosoma celular; todo esto mediante el recubrimiento completo de la partícula viral por los anticuerpos (Heinz y Stiasny, 2017).

Algunos de los anticuerpos producidos durante una primera infección por DenV pueden ser los causantes del fenómeno ADE durante una segunda infección por un serotipo distinto al de la primera infección (Figura 8) (Martínez *et al.*, 2017; Betancourt, 2010; Munar *et al.*, 2019). Este fenómeno se debe a que en esa segunda infección el virus es reconocido, pero no neutralizado por anticuerpos generados en la primera infección. Los complejos virus no neutralizados-anticuerpos se unen a través de la fracción constante del anticuerpo (Fc) a los receptores Fc gamma (FcγR) presentes en monocitos, macrófagos y células dendríticas, y con esto se facilita el ingreso e incrementa la infección. La consecuencia es una elevada viremia y severidad de la infección (Martínez *et al.*, 2017; Betancourt, 2010; Munar *et al.*, 2019). El ADE ocurre principalmente porque anticuerpos de amplio espectro contra zonas inmaduras de la primera infección reconocen a partículas virales parcialmente inmaduras de la segunda infección sin cubrir las zonas maduras (Rey *et al.*, 2018).

Por otro lado, los anticuerpos de amplio espectro que reconocen epítomos expuestos en zonas maduras también pueden reconocer partículas inmaduras no estables, que exponen transitoriamente los epítomos que normalmente se encuentran en las zonas maduras (Rey *et al.*, 2018). Un anticuerpo de amplio espectro específico de epítomos de zonas maduras puede cubrir a partículas maduras y parcialmente inmaduras, y, por lo tanto, neutralizar al virus; sin embargo, también puede ser causante de ADE si no se encuentra en concentraciones suficientes o si tiene baja afinidad por el antígeno viral (Rey *et al.*, 2018; Fernandez *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2020).

A**Primera infección**

Zona inmadura
epítomos crípticos
expuestos

Zona madura



Anticuerpos específicos para un solo serotipo

-  : anticuerpo específico de epítomos de zona madura, que también puede reconocerlos en la zona inmadura
-  : anticuerpo específico que reconoce un epítopo críptico

Anticuerpos de amplio espectro que reconocen zonas conservadas entre los cuatro serotipos

-  : anticuerpo específico de epítomos de zona madura, que también puede reconocerlos en la zona inmadura → **Neutralizante de amplio espectro.** Podría causar ADE cuando está en bajas concentraciones o si es de baja afinidad
-  : anticuerpo específico que reconoce un epítopo críptico → **Causante de ADE**

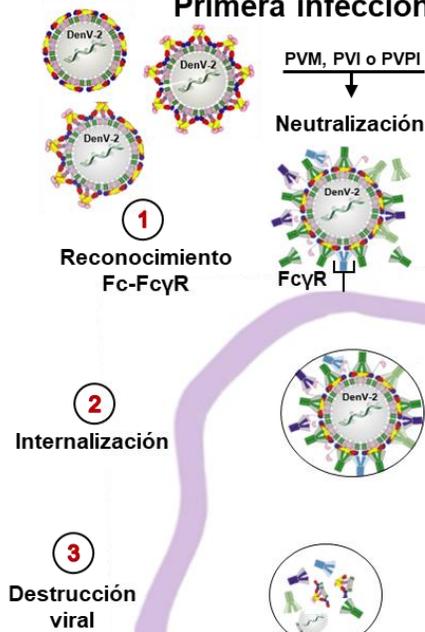
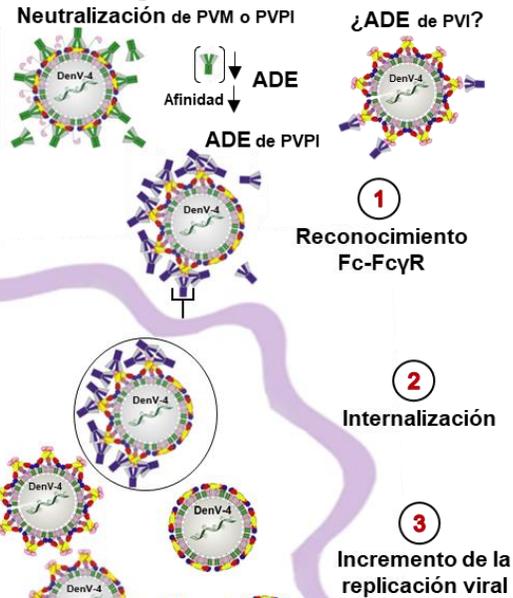
B**Primera infección****Segunda infección**

Figura 8. Infección con virus dengue y representación esquemática del fenómeno “potenciación de la infección mediada por anticuerpos”. (A) Anticuerpos generados durante una primera infección con

alguno de los cuatro serotipos de DenV, en este ejemplo, con DenV-2. (B) Comparación entre una primera y segunda infección y esquema de ADE, en un macrófago. La segunda infección ocurre por un serotipo distinto al de la primera infección (DenV-2), en este ejemplo, DenV-4. ADE: potenciación de la infección mediada por anticuerpos, PVM: partícula viral madura, PVI: partícula viral inmadura, PVPI: partícula viral parcialmente inmadura, Fc: fracción constante del anticuerpo, FcγR: receptor Fc gamma (modificado de Rey *et al.*, 2018; Martín-Acebes *et al.*, 2018).

La existencia del fenómeno ADE entre los serotipos de DenV ha sido evidenciada en muchos estudios de laboratorio, clínicos y epidemiológicos. Se ha observado *in vitro* en cultivos celulares, *in vivo* en ratones y en primates no humanos, y en estudios de cohorte en humanos. De las evaluaciones en humanos, sobresale una realizada en más de 6500 individuos (Martínez *et al.*, 2017; Betancourt, 2010; Munar *et al.*, 2019; Langerak *et al.*, 2019; Katzelnick *et al.*, 2017).

Asimismo, existe evidencia de que el fenómeno ADE puede ocurrir entre los cuatro serotipos de DenV y el único serotipo de ZikV, debido a que ambos *Flavivirus* tienen de 55% a 57%, y de 41% a 47% de similitud entre sus proteínas E y prM, respectivamente (Sun *et al.*, 2020; Grifoni *et al.*, 2017).

En los estudios de ADE en cultivo celular, se ha observado que anticuerpos aislados de una infección con ZikV pueden incrementar la replicación de DenV, y de igual manera, anticuerpos contra DenV potencian la replicación de ZikV (Martínez *et al.*, 2017). Con respecto a las evaluaciones *in vivo* en ratones, existen dos estudios que demuestran el ADE para DenV mediante el incremento de la severidad de la enfermedad y mortalidad causada por inmunidad previa contra ZikV (Langerak *et al.*, 2019); y para el caso de ZikV, hay un trabajo desarrollado por Bardina *et al.* (2017), en el que se evidencia ADE con incremento de morbilidad y mortalidad por previa exposición a anticuerpos contra DenV. Para el caso de experimentos con monos Rhesus, un grupo de individuos fueron infectados con ZikV, y posteriormente infectados con DenV, lo cual resultó en ADE de DenV con infección potenciada, pero sin signos de severidad de la enfermedad. Por otro lado, el ADE de ZikV por anticuerpos contra DenV no ha sido demostrado hasta ahora en primates no humanos. En el caso de humanos, existe evidencia de ADE para DenV por exposición previa a ZikV, pero no de ADE para ZikV por exposición previa a DenV (Figura 9) (Langerak *et al.*, 2019; Katzelnick *et al.*, 2020).

Estudios de ADE para DenV y ZikV

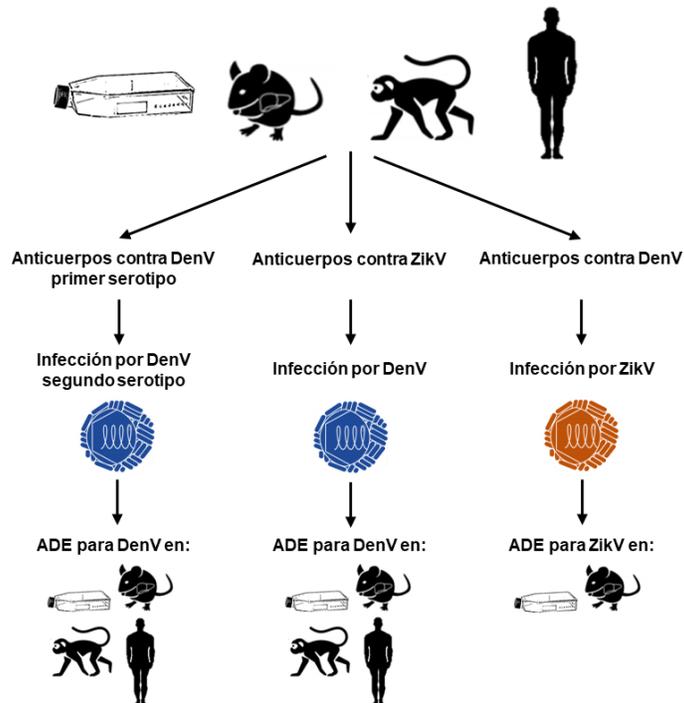


Figura 9. Evidencia de fenómeno “potenciación de la infección mediada por anticuerpos” entre serotipos de virus dengue, y entre virus dengue y virus Zika. Se muestran resultados de evaluaciones en cultivo celular, ratones, primates no humanos y en humanos que poseían inmunidad previa o anticuerpos contra DenV y luego se infectaron con otro serotipo de DenV o ZikV, o que poseían anticuerpos contra ZikV y luego se infectaron con DenV (Algunas imágenes fueron tomadas de Corneillie *et al.*, 2019).

El fenómeno ADE puede presentarse de distintas formas, pero se resume en que existen anticuerpos que potencian la infección. Este fenómeno ya se ha reportado para otros patógenos, como virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (Robinson *et al.*, 1988), virus sincitial respiratorio (RSV) (Gimenez *et al.*, 1989), virus del Ébola (Takada *et al.*, 2001), virus de la influenza, virus del oeste del Nilo, virus de la encefalitis japonesa, virus de la peritonitis infecciosa felina (Weiss y Scott, 1981), virus de la fiebre aftosa (Mason *et al.*, 1993), virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino, virus de la fiebre hemorrágica de simios, virus del río Ross, entre otros (Halstead *et al.*, 2010; Suhrbier y La Linn, 2003; Takada y Kawaoka, 2003; Tirado y Yoon, 2003; Halstead, 2014). Incluso el ADE también se ha reportado en infección por bacterias, como *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis* (Zimmermann *et al.*, 2016), y *Acinetobacter baumannii* (Wang-Lin *et al.*, 2019); y protozoarios, como *Leishmania mexicana* (Buxbaum y Scott, 2005; Halstead, 2014). Estos reportes de ADE presentan evidencia basada en ensayos *in*

vitro y/o *in vivo* (Halstead *et al.*, 2010; Suhrbier y La Linn, 2003; Takada y Kawaoka, 2003; Tirado y Yoon, 2003; Halstead, 2014; Wang-Lin *et al.*, 2019).

2.3.2. La importancia de una vacuna dual contra DenV y ZikV, y epítomos de la proteína E

Debido a que existe riesgo de ADE entre DenV y ZikV, y a que ambos virus son transmitidos principalmente por el mismo vector y cocirculan en diferentes partes del mundo (Tang *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2020), se requiere una vacuna que induzca inmunidad contra ambos virus.

El principal blanco para una vacuna contra ambos virus es la proteína E, la cual está formada por tres ectodominios (DI, DII y DIII) y un dominio transmembrana (TM) (Figura 10) (Tai *et al.*, 2018). Los epítomos de la proteína E fueron descubiertos mediante anticuerpos monoclonales (AcMs) aislados de humanos y ratones infectados con DenV o ZikV (Figura 10) (Diamond *et al.*, 2019; Fibriansah y Lok, 2016). Algunos epítomos solo dependen del monómero de la proteína E para su formación, como los presentes en el bucle de fusión (*fusion loop*) en el DII (DII-FL), y en la cresta lateral (*lateral ridge*) en el DIII (DIII-LR). Por otro lado, otros epítomos dependen del dímero de proteína E (cuaternarios o conformacionales) para su formación, como el “epítomo dependiente del dímero de la proteína E” (EDE), el cual está formado por sitios en DI y DII de un monómero, y por residuos en DII y DIII del otro monómero. Otro epítomo se forma entre la interfase de los DII de un dímero de proteína E. Otro epítomo es interdímero y está formado principalmente por sitios en DIII de dos dímeros adyacentes, y también, por sitios en DI. Otro epítomo interdímero se forma entre dos dímeros adyacentes a través de sus DII (Figura 10) (Dai *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Fernandez y Diamond, 2017; Diamond *et al.*, 2019).

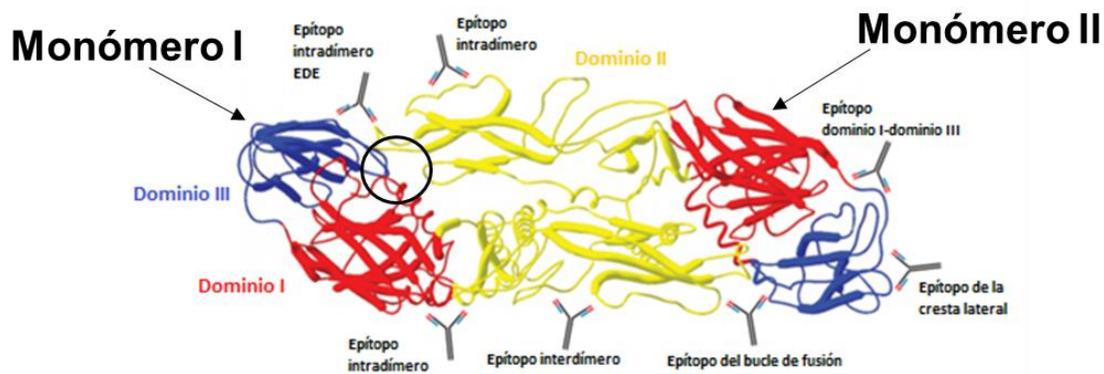


Figura 10. Dímero de la proteína E y epítomos de la proteína E identificados mediante anticuerpos monoclonales (adaptado de Diamond *et al.*, 2019). Cada monómero se muestra formado por un dominio I, un dominio II y un dominio III.

Dejnirattisai *et al.* (2015) identificaron 145 AcMs a partir de células B activadas o plasmablastos de siete individuos infectados con DenV; posteriormente observaron que, de estos anticuerpos, los dirigidos contra el epítipo DII-FL neutralizan a todos los serotipos de DenV, pero no a ZikV. Por el contrario, los anticuerpos dirigidos contra el epítipo EDE mostraron actividad neutralizante de amplio espectro para todos los serotipos de DenV y el serotipo de ZikV (Barba-Spaeth *et al.*, 2016). El epítipo EDE se divide en EDE1 y EDE2. El primero no está glicosilado, mientras que el segundo presenta N-glicosilación en la posición N154 de la proteína E. La neutralización viral es mayor a través de AcMs dirigidos contra EDE1 en comparación a la obtenida mediante AcMs anti-EDE2 (Fernandez *et al.*, 2017; Barba-Spaeth *et al.*, 2016). El epítipo DII-FL es un epítipo críptico, y, por lo tanto, los anticuerpos dirigidos contra este epítipo no pueden unirse con una estequiometría suficiente para neutralizar al virus, en partículas virales parcialmente inmaduras; lo cual finalmente lo vincula con el fenómeno ADE (Sun *et al.*, 2020; Barba-Spaeth *et al.*, 2016). En general, los anticuerpos contra el epítipo FL e incluso contra la proteína prM están fuertemente vinculados con la inducción de ADE, y ambos anticuerpos se han encontrado de manera predominante entre los componentes de la respuesta inmune humoral en pacientes que cursaron por una infección con DenV (Rey *et al.*, 2018). Por lo tanto, inmunizar con una vacuna que contenga a la proteína E completa o a la proteína prM, tiene el riesgo de inducir ADE. Un candidato vacunal basado en solo un epítipo, por ejemplo, el epítipo EDE,

podría ser una opción de vacuna dual contra ambos *Flavivirus* sin riesgo de inducir ADE

2.3.3. Mimótopos como candidatos vacunales y su uso contra DenV y ZikV

Muchos de los epítomos que inducen protección sin vincularse a fenómenos como el ADE no están conformados por una secuencia lineal de aminoácidos (epítomos lineales), sino de secuencias discontinuas que forman una estructura determinada (epítomos conformacionales) (Figura 11A), lo cual dificulta su obtención aislada del resto de epítomos no deseados a partir de un antígeno (Barba-Spaeth *et al.*, 2016; Buhrman y Slansky, 2013; O'Rourke *et al.*, 2014; Sanchez-Trincado *et al.*, 2017; Muller, 1999).

Una alternativa para la obtención de un epítomo conformacional de manera aislada es el uso de un mimótopo. Este es un péptido de secuencia diferente a un epítomo, pero mimetiza su capacidad de unión al complejo mayor de histocompatibilidad “*major histocompatibility complex* (MHC)” y a las inmunoglobulinas, y de ser reconocido por células del sistema inmune, como linfocitos B y T. El mimótopo puede inducir la respuesta inmune como si fuera el epítomo original (Figura 11A) (Crawford *et al.*, 2004; Knittelfelder *et al.*, 2009).

Uno de los métodos más empleados para la identificación de mimótopos es la técnica de despliegue en fagos, debido a que permite evaluar la afinidad entre librerías de péptidos expresados en la superficie de fagos recombinantes y AcMs que reconocen a un epítomo específico. Para esto, la mezcla de fagos recombinantes se tamiza con un anticuerpo monoclonal (AcM) unido a una superficie, se realizan lavados para retirar los fagos que no se unieron, se eluyen los fagos unidos y se amplifican en cultivos bacterianos. Esta ronda de tamizaje se repite por una o más veces para enriquecer a los péptidos con alta afinidad por el anticuerpo. Se secuencian los fagos para identificar a los péptidos que interactuaron con el anticuerpo, y finalmente se seleccionan los péptidos que más veces se repitieron en la secuenciación, los que serían los más afines (Figura 11B) (Gagic *et al.*, 2016; O'Rourke *et al.*, 2014).

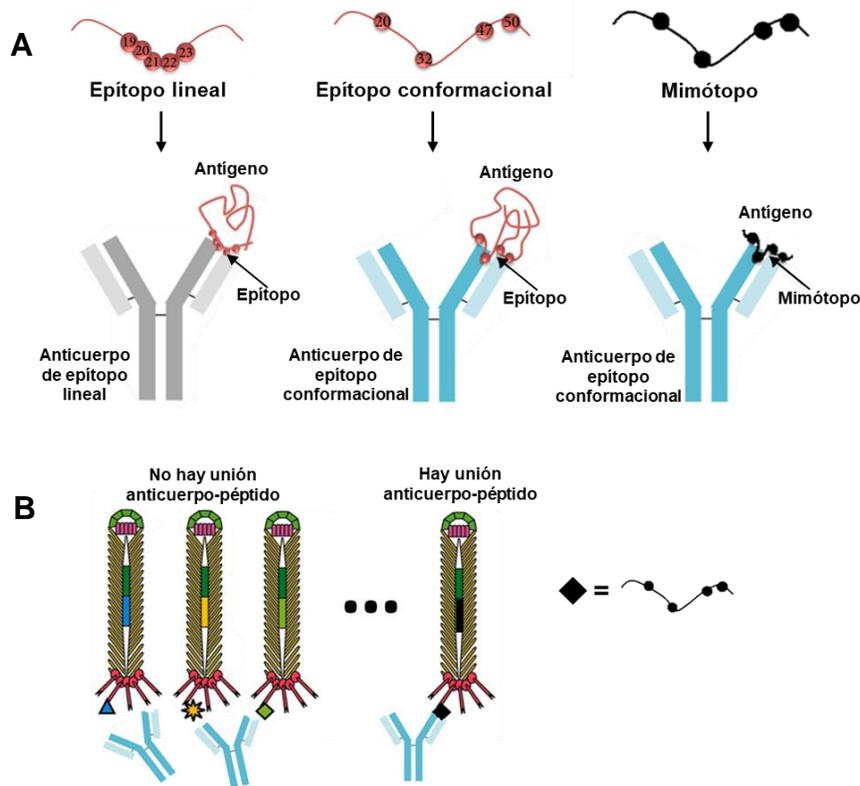


Figura 11. Tipos de epítipo, mimótopo, y la técnica de despliegue en fagos. (A) Esquema de un epítipo lineal formado por residuos continuos, un epítipo conformacional formado por residuos discontinuos, un mimótopo formado por residuos discontinuos, y sus interacciones con anticuerpos. (B) Descubrimiento de un mimótopo mediante la técnica de despliegue de péptidos en fagos y su interacción con un anticuerpo monoclonal (modificado de Sanchez-Trincado *et al.*, 2017; Gagic *et al.*, 2016).

Diferentes estudios han evaluado candidatos a vacuna contra diferentes virus basados en mimótopos. Un trabajo reportado por Steward (2001) evaluó un candidato vacunal basado en mimótopos de un epítipo conformacional de la proteína de fusión de RSV, este indujo anticuerpos neutralizantes contra RSV y redujo el título de virus en ratones que fueron retados con RSV después de ser inoculados con los mimótopos.

En el 2009 se reportó la inducción de anticuerpos IgG específicos contra la glicoproteína de virus de la rabia, mediante la administración de mimótopos en ratones BALB/c (Houimel y Dellagi, 2009). Hessell y colaboradores (2016) indujeron anticuerpos neutralizantes específicos contra la región hipervariable 3 (V3) de la proteína de envoltura gp160 de HIV, inmunizando macacos Rhesus con mimótopos

de V3. Otros estudios también han generado mimótopos de antígenos de virus de la hepatitis A, de la hepatitis B, de la hepatitis C y de virus de la encefalitis japonesa (Szalai *et al.*, 2008).

Para el caso de una vacuna dual contra DenV y ZikV, la M. en C. Esmeralda Cuevas de nuestro grupo de investigación ha descubierto tres mimótopos del epítipo EDE1 (datos no publicados) a través de la técnica de despliegue en fagos y el AcM EDE1-C8, el cual fue descubierto por Dejnirattisai *et al.* (2015) como un anticuerpo que neutraliza a los cuatros serotipos de DenV y a ZikV. De los mimótopos identificados, uno con secuencia “HSPLEKPVPHRS” resultó ser el mejor según los resultados de la técnica de despliegue en fagos, por lo que resulta el más atractivo para emplearse como vacuna. Al realizar alineamientos con las proteínas E de DenV-2 y ZikV, este mimótopo se alineó desde la posición 94 para DenV-2, y desde la posición 72 para DenV-2 y ZikV al invertir la secuencia del mimótopo, presentando de dos a cuatro aminoácidos idénticos, y otros con similares características fisicoquímicas (posiciones referentes a proteína E de DenV-2 cepa Nueva Guinea, número de acceso: AF038403.1; y, proteína E de ZikV cepa africana MR-766, número de acceso: KX377335.1) (Figura 12). Estas posiciones de la proteína E forman parte de las regiones de interacción con el anticuerpo EDE1-C8 descritas por Barba-Spaeth *et al.* (2016).

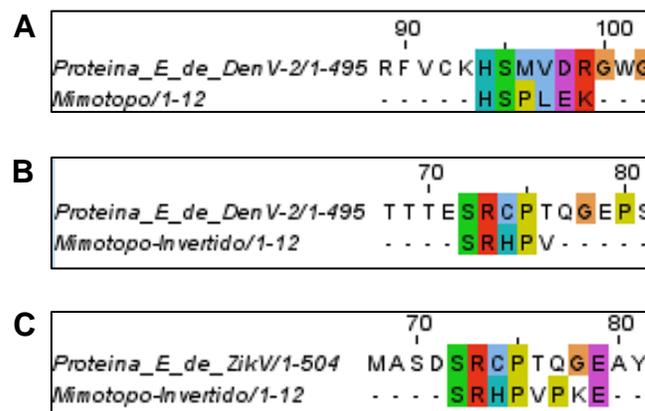


Figura 12. Alineamiento entre la secuencia de la proteína E de virus dengue del serotipo 2 o virus Zika y la secuencia del mimótopo. (A) Alineamiento entre la secuencia de la proteína E de DenV-2 y la secuencia del mimótopo. (B) Alineamiento entre la secuencia de la proteína E de DenV-2 y la

secuencia invertida del mimótopo. (C) Alineamiento entre la secuencia de la proteína E de ZikV y la secuencia invertida del mimótopo.

2.4. Virus adeno-asociado (VAA)

VAA pertenece a la familia *Parvoviridae* y al género *Dependovirus*. Este virus para su replicación requiere de la coinfección de la célula huésped por otros virus como adenovirus, herpesvirus o virus del papiloma humano (HPV) (virus auxiliares), o una señal de estrés (Bastola *et al.*, 2020). Este virus hasta ahora se ha clasificado en 12 serotipos que han sido bien caracterizados (de VAA-1 hasta VAA-12), los cuales, entre sí, presentan variabilidad de tropismo por distintos tipos celulares. Más de 100 nuevos serotipos han sido recientemente descubiertos, los que infectan a distintos animales además de al humano, y ninguno ha sido reportado como patógeno (He *et al.*, 2019). VAA tiene forma icosaédrica, no posee envoltura y presenta entre 18-26 nm de diámetro. Este virus está formado por una cápside compuesta de 5 proteínas VP1, 5 proteínas VP2 y 50 proteínas VP3 (relación 1:1:10), y un genoma de DNA de cadena sencilla de aproximadamente 4.7 kb (Figura 13) (Singer *et al.*, 2016; Murphy y Vile, 2002).

El genoma posee dos regiones codificantes flanqueadas por elementos ITR, estas regiones corresponden a los genes *rep* y *cap*, los cuales codifican para un total de nueve proteínas (Figura 13) (Maurer y Weitzman, 2020). A través de dos promotores distintos, dos inicios de transcripción distintos y “*splicing alternativo*”, el gen *rep* da origen a cuatro proteínas no estructurales. Las secuencias codificantes de las proteínas Rep78 y Rep68 se transcriben a partir del promotor p5 y las secuencias codificantes de las proteínas Rep50 y Rep42, a partir del promotor p19. Estas proteínas son esenciales para la replicación, integración, regulación transcripcional y el ensamblaje viral (Gaj *et al.*, 2016). Por otro lado, el gen *cap* codifica para las tres proteínas estructurales (VP1, VP2 y VP3) de VAA, las secuencias codificantes de estas tres proteínas se encuentran bajo el mismo promotor, p40. El RNAm es procesado mediante “*splicing alternativo*”, para finalmente ser traducido en las tres VPs, las que comparten la misma secuencia en el extremo carboxilo terminal, pero difieren en el amino terminal (Gaj *et al.*, 2016; Maurer y Weitzman, 2020). Estas

proteínas tienen las funciones principales de formar la cápside que protege al genoma viral, y ser las responsables de la unión e internalización hacia la célula blanco (Naso *et al.*, 2017). De manera específica, VP3 está formada por ~530 aa y forma el monómero estructural básico de la cápside; VP1 y VP2 contienen la secuencia completa de VP3 y la misma estructura, pero poseen 202 aa y 65 aa más en la región N-terminal, respectivamente. La proteína VP1 contiene un dominio de fosfolipasa A₂ (PLA₂) en su secuencia no compartida con las otras VPs, el extremo N-terminal de esta proteína se encuentra en el interior de la cápside, pero durante la fase de infección sale a través del poro en el eje de simetría cinco de la partícula viral, lo que permite el escape viral del endosoma/lisosoma durante el tráfico hacia el núcleo a través de la hidrólisis del enlace éster sn-2 de los glicerofosfolípidos (Kurian *et al.*, 2019 ;Valdés Rodríguez *et al.*, 2002). No hay reportes sobre el requerimiento de VP2 para el ensamblaje o para la infectividad (Maurer *et al.*, 2019). Otra proteína codificada por el gen *cap*, empleando el mismo promotor p40 para la transcripción, pero usando un marco de lectura diferente para la traducción, es la denominada “proteína activadora del ensamblaje” (*assembly-activating protein*) (AAP), la cual es considerada como la proveedora de un andamiaje para el ensamblaje viral, y se ha determinado como esencial para la localización nucleolar de las proteínas VPs y el ensamblaje de serotipos como el 2 y el 8, pero no para otros, como los serotipos 4 y 5 de VAA (Naso *et al.*, 2017; Maurer *et al.*, 2019). Por último, otra proteína codificada por el gen *cap* ha sido identificada en los últimos años. Ésta es la “proteína accesoria asociada a membrana” (*membrane-associated accessory protein*) (MAAP), ésta se transcribe usando el mismo promotor p40, pero se traduce a partir de un marco de lectura diferente a los anteriores. La función precisa de MAAP aún no está definida, pero parece tener un rol en la replicación viral (Maurer y Weitzman, 2020).

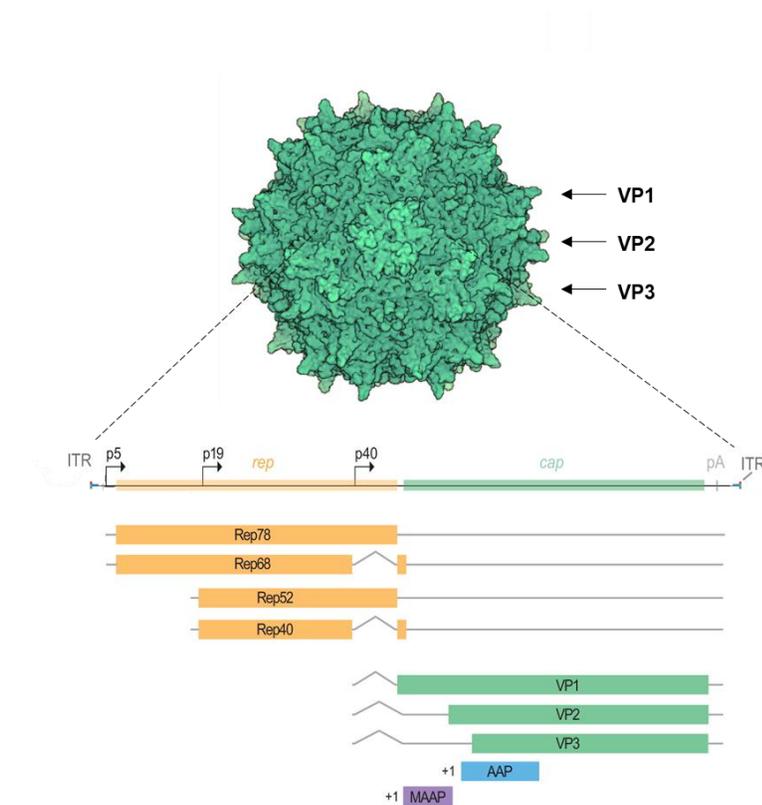


Figura 13. Estructura y organización del genoma de virus adeno-asociado (estructura 1LP3 del *Protein Data Bank* (PDB); tomado de Maurer y Weitzman, 2020).

El ciclo de replicación de VAA inicia con su unión a receptores celulares primarios específicos, como proteoglicanos de heparán sulfato para el serotipo 2 o ácido siálico para el serotipo 5, luego ingresa mediante endocitosis mediada por receptores secundarios. Debido al pH bajo del endosoma la cápside sufre un cambio conformacional y PLA₂ actúa liberando a la partícula del endosoma. La partícula llega al núcleo, el genoma viral es liberado y convertido de cadena sencilla a cadena doble, principalmente por la actividad de las DNA polimerasas celulares, luego los genomas forman concatémeros que pueden permanecer como episomas o pueden integrarse al cromosoma humano 19 y permanecer latentes. En presencia de un virus auxiliar como adenovirus, VAA puede salir de su estado de latencia e iniciar un nuevo ciclo de replicación. Los virus auxiliares de manera indirecta favorecen a la activación transcripcional, transporte de RNA, traducción, replicación del genoma, ensamblaje y empaquetamiento del genoma de VAA (Gaj *et al.*, 2016; Moore *et al.*, 2015).

2.5. Uso de VAA para el desarrollo de vacunas

2.5.1. Vectores virales de VAA

VAA ha sido empleado como vector viral debido a que no es patógeno, puede transducir numerosos tipos celulares en división y en reposo, presenta baja inmunogenicidad y por esto es más probable que llegue a su célula blanco sin ser detenido antes por el sistema inmune, pueden mediar la expresión génica del transgen hasta por 12 meses (Mena-Enriquez *et al.*, 2012); además, es uno de los virus más pequeños, y son muy estables en un amplio rango de pH y de temperatura, por lo que su manipulación resulta sencilla (Maurer *et al.*, 2019; Nieto *et al.*, 2012). Principalmente, VAA ha sido empleado como vector viral para el desarrollo de terapias génicas para enfermedades del sistema cardiovascular, en trastornos neurodegenerativos, defectos óseos, lesiones del cartílago, artritis reumatoide, entre otras (Singer *et al.*, 2016). Actualmente, existen tres terapias basadas en vectores de VAA aprobadas para su uso en humanos, denominadas Glybera (deficiencia de lipoproteína lipasa), Luxturna (amaurosis congénita de Leber 2) y Zolgensma (atrofia muscular espinal) (Meier *et al.*, 2020). En el caso de vacunas vectorizadas de VAA, no hay ninguna aprobada para su uso en humanos, pero existen muchos candidatos en desarrollo y que han sido evaluados en ensayos preclínicos contra virus del herpes simple (HSV), coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave, HPV, DenV, entre otros (Nieto *et al.*, 2014); y en ensayos clínicos, como el desarrollado contra VIH (Priddy *et al.*, 2019).

2.5.2. Andamios de VAA para despliegue de péptidos

Una PPV de VAA puede ser empleada como andamio o acarreador para desplegar péptidos vacunales e incrementar la inmunogenicidad de estos, ya que usualmente las vacunas basadas en péptidos libres son poco inmunogénicas (O'Rourke *et al.*, 2014). Las ventajas del andamio de VAA para el despliegue de epítomos se deben a su naturaleza de antígeno particulado, el cual es más inmunogénico que un antígeno soluble (péptido) (Snapper, 2018); a que presenta de manera repetitiva a un péptido inmunogénico para facilitar el entrecruzamiento de receptores de

linfocitos B (hasta 60 veces, polivalencia), al estar formado por 60 proteínas estructurales; a su alta estructuración y a sitios que toleran la inserción de péptidos en las proteínas de la cápside, lo que permite el despliegue de la estructura adecuada del péptido para inducir la respuesta inmune deseada; y por último, a la inmunidad existente contra VAA, esto ayuda a que el sistema inmune reconozca rápidamente a los andamios de VAA y a los péptidos desplegados (Nieto *et al.*, 2012; O'Rourke *et al.*, 2014). Todo esto resulta en una respuesta inmune de títulos altos y de larga duración de anticuerpos (O'Rourke *et al.*, 2014). Además, los andamios de VAA, al ser PPV, son incapaces de transferir material genético que podría integrarse en el genoma del huésped (Jagu *et al.*, 2015). En comparación a otras cápsides virales empleadas como andamios, las de VAA cuentan con el respaldo de ser aprobadas para su uso en terapias génicas humanas, y ser cápsides relativamente sencillas en su manipulación (Zhao *et al.*, 2019; Singer *et al.*, 2016).

De todos los serotipos de VAA, el 2 ha sido el más estudiado, y también el más empleado para inserciones sobre sus proteínas que modifiquen su tropismo celular, y es el único reportado para despliegue de péptidos vacunales (Börner *et al.*, 2020; Büning y Srivastava, 2019; Singer *et al.*, 2016; Nieto *et al.*, 2012). De los estudios con VAA-2, se sabe que, además de las cápsides formadas por las tres proteínas VPs, también se pueden formar cápsides con solo proteína VP3; pero en ambos casos para se requiere de la proteína AAP (Nieto *et al.*, 2012).

Alrededor de las protuberancias del eje de simetría tres de la cápside de VAA, se encuentran cinco de las nueve regiones denominadas como variables (VR) de las proteínas VPs. De éstas, las VR-IV, VR-V y VR-VIII forman bucles en la parte superior de las protuberancias, y son las regiones preferidas para el despliegue de péptidos (Börner *et al.*, 2020; Büning y Srivastava, 2019). Diferentes posiciones se han empleado para insertar péptidos en la región común entre las tres proteínas VPs de VAA. En el caso de VAA-2, se han empleado las posiciones 453, 520, 584, 585, 587, 588 (posiciones con respecto a la proteína VP1 de VAA-2); mientras que en otros serotipos como el 1, 3, 4, 5, 6, 8 y 9 se han empleado con mayor frecuencia las posiciones 590, 586, 586, 575, 585, 590, y 589, respectivamente, las cuales son

posiciones similares a la 587 de VAA-2 (Büning y Srivastava, 2019). La posición 587 de VAA-2 y las similares a ésta en los otros serotipos, son parte del VR-VIII, el cual forma la parte superior de la segunda protuberancia más alta de las presentes en el eje de simetría triple (Büning y Srivastava, 2019).

Las posiciones 453 y 587 de VAA-2 han sido empleadas para la inserción de péptidos vacunales, siendo 587 la más usada; en la posición 453 se ha insertado hasta 35 aminoácidos, mientras que en la posición 587, hasta 34 aminoácidos sin interferir con el ensamblaje de las PPV (Börner *et al.*, 2020; Büning y Srivastava, 2019; Singer *et al.*, 2016; Jagu *et al.*, 2015; Manzano-Szalai *et al.*, 2014; Nieto *et al.*, 2012). Los pocos trabajos que han desplegado péptidos mediante inserción en las proteínas de la cápside de VAA con la finalidad de inducir y evaluar una respuesta inmune contra dichos péptidos, corresponden a los desarrollados por Nieto *et al.* (2012), Manzano-Szalai *et al.* (2014), Jagu *et al.* (2015) y Singer *et al.* (2016).

Nieto *et al.* (2012) generaron PPV de VAA-2 que desplegaron dos insertos, uno de 35 aa en la posición 453 y otro de 31 aa en la posición 587. En la primera posición se desplegó el epítipo L2 del serotipo 31 del HPV, y en la segunda, el epítipo L2 del serotipo 16. Estas partículas quiméricas con dos insertos se emplearon para inmunizar ratones y conejos, dando como resultado la inducción de títulos altos de anticuerpos IgG y de anticuerpos neutralizantes contra ambos serotipos, e incluso se obtuvieron anticuerpos de neutralización cruzada hacia otros serotipos de HPV. En la figura 14 se muestra la posición de las inserciones, las PPV generadas y el nivel de anticuerpos neutralizantes inducidos. De manera similar, Jagu *et al.* (2015) desplegaron epítipos de L2 de HPV, obtuvieron anticuerpos neutralizantes contra HPV y protección frente al reto. Singer *et al.* (2016) desarrollaron un sistema novedoso de despliegue de péptidos en la cápside de VAA-2, por el cual hallaron mimótipos de HER-2, un blanco importante para inmunoterapia contra cáncer de mama. Al inmunizar ratones con PPV que desplegaron mimótipos de HER-2, indujeron anticuerpos específicos contra HER-2 y el retraso en el crecimiento de tumores. Por otra parte, Manzano-Szalai *et al.* (2014) desplegaron epítipos de ovoalbúmina (OVA) en los andamios de VAA-2, esto con la finalidad de demostrar

que los péptidos desplegados en andamios de VAA podían ser inmunogénicos y seguros (no inducir alergia). Al inmunizar ratones con PPV de VAA-2 desplegando epítomos de OVA, obtuvieron títulos altos de IgG1 contra OVA, títulos normales de IgE y no hubo reacción anafiláctica al retar con OVA vía intravenosa a diferencia del grupo que fue inmunizado directamente con OVA.

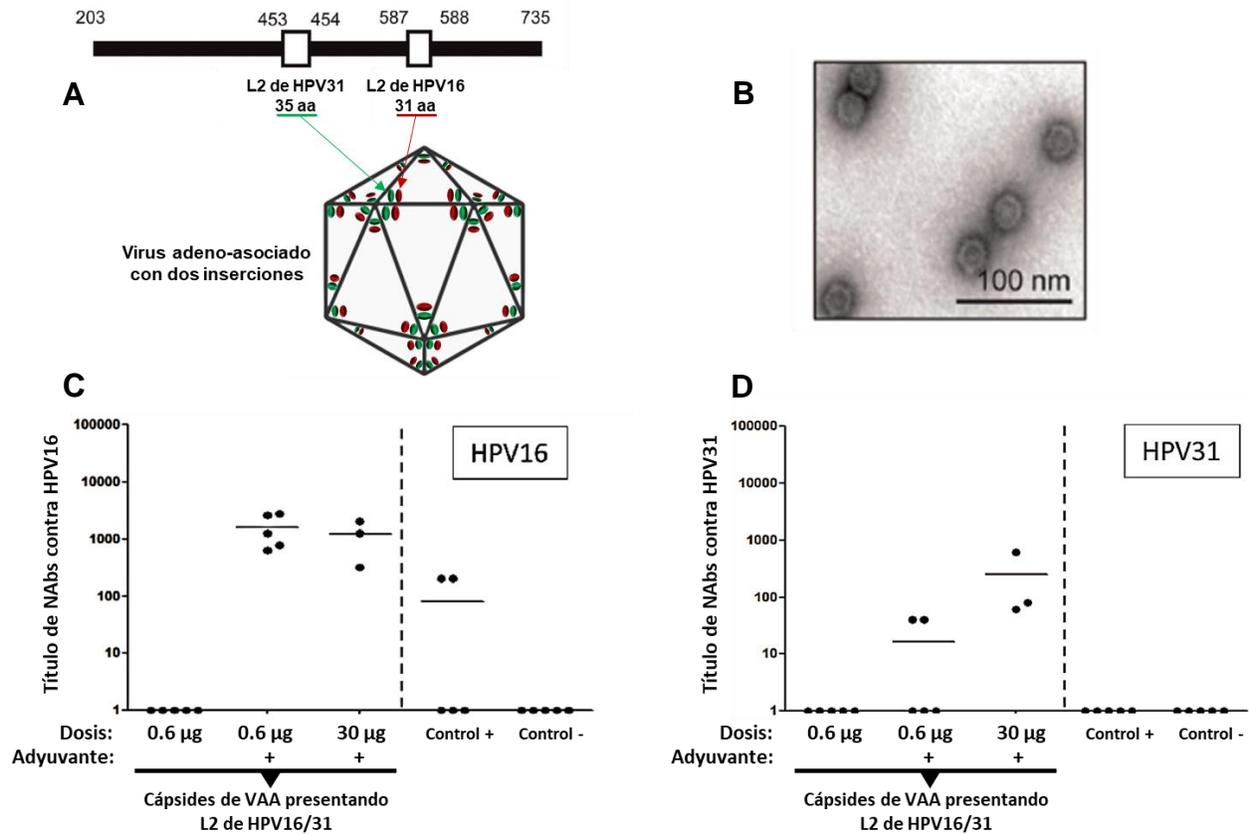


Figura 14. Generación de partículas pseudovirales de virus adeno-asociado que despliegan epítomos de virus del papiloma humano y detección de anticuerpos neutralizantes en ratones inmunizados (adaptado de Nieto *et al.*, 2012). (A) Representación de los sitios de inserción de los epítomos L2 de 20 aa de HPV31 y HPV16 dentro de la proteína VP3 de VAA. Los 35 aa y 31 aa incluyen a residuos adicionales a los 20 aa del epítomo que sirven como puente entre la proteína de la cápside y el epítomo. (B) PPV de VAA con los dos insertos vistas a través de microscopía electrónica de transmisión. (C) y (D) corresponden a la medición de anticuerpos neutralizantes contra HPV16 y HPV31, respectivamente. Los ratones fueron inmunizados dos veces y se usó como adyuvante a montanide ISA 51. Como control positivo se empleó a epítomos de L2 fusionados a tiorredoxina y como control negativo se usaron PPV de VAA sin modificar/sin insertos. NABs: anticuerpos neutralizantes.

Ante las ventajas mencionadas del andamio de VAA, el despliegue de un mimótopo del epítipo EDE1 de DenV y ZikV en este andamio, resultaría en una nueva estrategia para el desarrollo de una vacuna contra ambos virus sin causar ADE.

2.6. Obtención de partículas pseudovirales de VAA

Para la producción de vectores virales de VAA usualmente se emplean células de mamífero HEK293 o el sistema células de insecto-baculovirus (SCI-BV). Ambos sistemas requieren de los genes *rep*, *cap*, la secuencia del transgén que se quiere empaquetar en el vector viral; y en el caso de las células HEK293, además, genes o factores de un virus auxiliar, los cuales en el SCI-BV serían provistos por el baculovirus (Naso *et al.*, 2017; Penaud-Budloo *et al.*, 2018).

Para el caso de producción de partículas pseudovirales de VAA, solo se requiere del gen *cap*. Uno de los sistemas más empleados es el SCI-BV (Shao *et al.*, 2012). Para la generación del baculovirus que contenga el gen *cap* (bacCap) se emplean principalmente dos métodos, el sistema Bac-to-Bac de Invitrogen (Life Technologies) y el denominado flashBAC (Oxford Expression Technologies) (Bleckmann *et al.*, 2016); en el presente trabajo se empleó el primero. De manera general, los pasos para construir el bacCap con el sistema Bac-to-Bac son: 1) clonación del gen *cap* en el plásmido de transferencia “pFastBac”; 2) transformación de *Escherichia coli* DH10BAC™ con el vector de transferencia, y generación de un bácido recombinante que contenga el gen *cap*, mediante un proceso de transposición entre este vector y el bácido (contiene genoma del baculovirus) presente en *E. coli*; 3) aislamiento del bácido recombinante y transfección de células de insecto Sf9 para generar el bacCap; 4) ensayo en placa para aislamiento y selección de baculovirus productor de proteína recombinante; 5) amplificación de placa viral seleccionada; y, 6) titulación del stock de baculovirus (Sui *et al.*, 2014) (Figura 15).

Luego de obtener el bacCap, cultivos de células de insecto son infectados con este baculovirus para producir las PPV de VAA (Invitrogen, 2015; Shao *et al.*, 2012; Merten *et al.*, 2005). Finalmente, después de la producción, sigue el proceso de

purificación de las PPV, y para esto entre los métodos más empleados están la centrifugación por gradientes discontinuos de densidad y diferentes variantes de cromatografía (Zolotukhin *et al.*, 1999; Nass *et al.*, 2018).

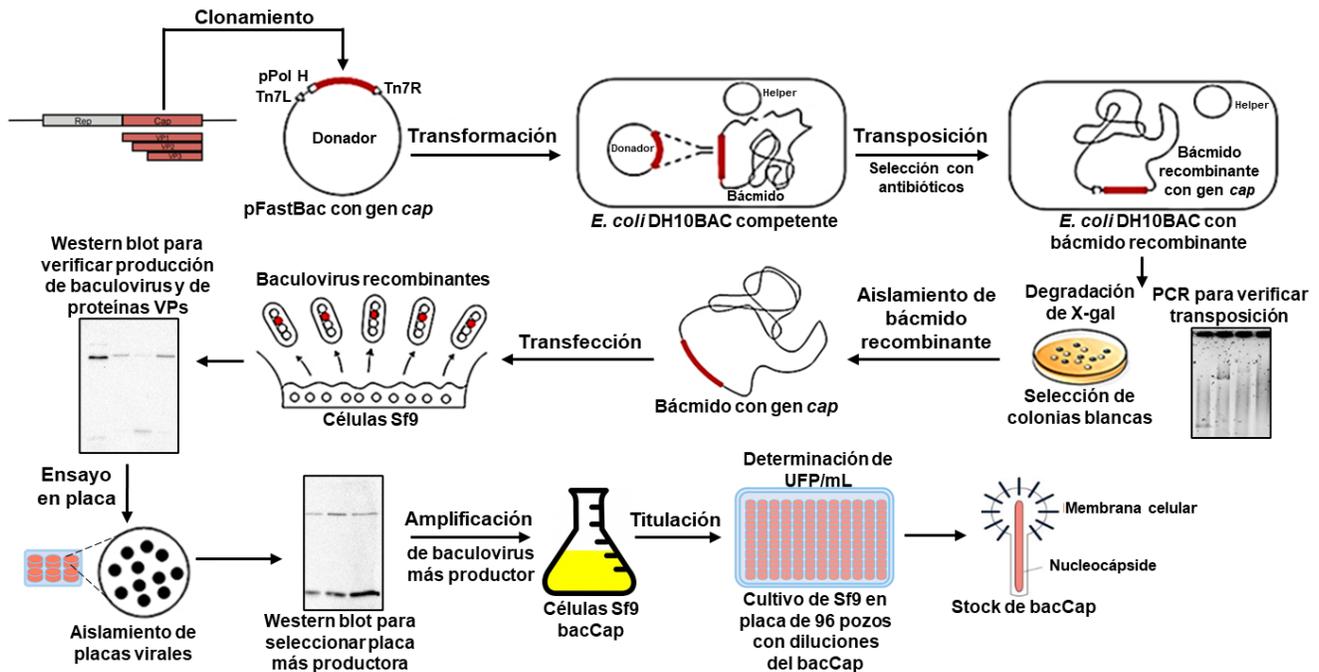


Figura 15. Flujo de trabajo del método Bac-to-Bac para generar un baculovirus recombinante que codifique el gen *cap* de virus adeno-asociado (bacCap) (modificado de Sui *et al.*, 2014).

2.7. Caracterización y evaluación de eficacia de vacunas candidatas

Para desarrollar una vacuna, es necesario contar con un proceso de producción, técnicas analíticas para su caracterización y un modelo animal para su evaluación preclínica. Es necesario obtener información de parámetros como la cantidad y rendimiento de la producción, la pureza, la identidad, el tamaño, la homogeneidad, y la estabilidad del antígeno; todo esto mediante pruebas como cuantificación de proteína total por el método de Bradford, evaluación de la pureza por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), identidad y tamaño por Western blot, homogeneidad por dispersión dinámica de luz, despliegue de determinantes antigénicos por Dot blot e *immunogolding*, o formación de PPV por

el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), microscopía electrónica o criomicroscopía electrónica (Dey *et al.*, 2014; Lua *et al.*, 2014; Zeltins, 2013).

La evaluación *in vivo* se realiza midiendo la respuesta inmune humoral, respuesta inmune celular, y/o retando a los individuos inmunizados con el patógeno infeccioso para determinar la protección que confiere la vacuna candidata. Con respecto a la respuesta inmune humoral, se pueden medir los niveles (títulos) de anticuerpos (IgG, IgA, entre otros), subclases de anticuerpos (IgG1, IgG2a, entre otros), y anticuerpos neutralizantes a través de pruebas de ELISA o neutralización por reducción de placas (PRNT). Con respecto a la respuesta inmune celular, se puede medir el nivel de citoquinas y quimiocinas; la activación y maduración de células del sistema inmune mediante la prueba de ELISA, ELISPOT o técnicas como citometría de flujo. Para evaluar la protección, además de medir anticuerpos neutralizantes; se reta a los animales inmunizados con el patógeno infeccioso y posteriormente se determina la carga del patógeno en las muestras de estos animales por técnicas como PCR (Richner *et al.*, 2017; Garg *et al.*, 2018; Malm *et al.*, 2017).

3. HIPÓTESIS

Un mimótopo del epítipo compartido EDE1 de DenV y ZikV desplegado en la superficie de la cápside de VAA-8 induce respuesta inmune contra ambos Flavivirus.

4. OBJETIVOS

4.1. General

Evaluar la inmunogenicidad de un mimótopo del epítipo compartido EDE1 de DenV y ZikV desplegado en la cápside de VAA-8.

4.2. Específicos

1. Construir un plásmido que contenga la secuencia del mimótopo insertada dentro de la secuencia del gen *cap* de VAA-8.
2. Producir un baculovirus recombinante que codifique para las proteínas VPs de VAA-8 con la inserción del mimótopo (bacCapMod).
3. Producir la cápside de VAA-8 que despliegue el mimótopo mediante el sistema células de insecto-baculovirus, y empleando bacCapMod.
4. Purificar y caracterizar la cápside de VAA-8 que despliegue el mimótopo.
5. Inmunizar ratones BALB/c con la cápside modificada de VAA-8, y evaluar la presencia de anticuerpos que reconozcan a DenV y ZikV.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Estrategia experimental

El presente trabajo se llevó a cabo con la finalidad de desarrollar un candidato a vacuna contra DenV y ZikV a través de la presentación de un mimótopo del epítipo EDE1 en la cápside de VAA-8.

Se construyó el plásmido pSR660M1, el cual contiene la secuencia del mimótopo insertada dentro del gen *cap* de VAA-8. El plásmido pSR660M1 se empleó para generar el vector de expresión baculovirus bacCapMod, el cual posteriormente se usó para la producción de la cápside de VAA-8 que despliega al mimótopo, en células de Sf9. Estas cápsides se purificaron y caracterizaron. Finalmente, ratones BALB/c se inmunizaron con este candidato vacunal, y se evaluó la respuesta inmune humoral específica de DenV y ZikV.

En la figura 16 se muestra el flujo de trabajo empleado para el desarrollo del presente trabajo.

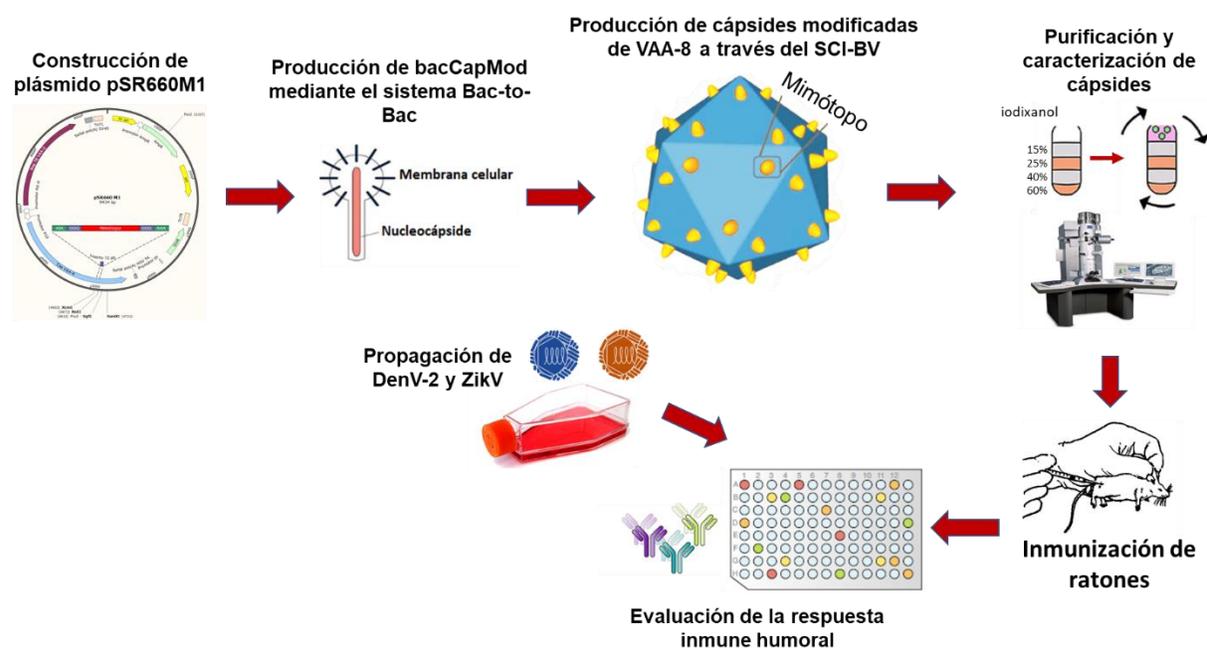


Figura 16. Flujo de trabajo del presente proyecto.

5.1. Plásmidos

En este trabajo se emplearon los plásmidos pSR660, pJET2.1/blunt y pSR660M1. El plásmido pSR660 fue amablemente donado por el Dr. Robert Kotin (NIH, EUA). El pSR660 corresponde al vector de transferencia pFastBac dual (Invitrogen™) (Anexo 1, Figura A1) que tiene clonadas las secuencias del gen *rep* de VAA-2, bajo el control transcripcional del promotor de poliedrina (P_H); así como la secuencia del gen *cap* de VAA-8, bajo el control transcripcional del promotor P_{10} ; además posee una secuencia señal de poliadenilación del virus SV40 para el gen *rep*, una secuencia señal de poliadenilación del gen *TK* de HSV para el gen *cap*, y un gen de resistencia a gentamicina (GmR), y todos estos elementos se encuentran flanqueados por los extremos del transposón Tn7, de tal manera que se tiene un miniTn7. El gen *cap* clonado en este vector es policistrónico y codifica para las tres proteínas estructurales (VP1, VP2 y VP3) de VAA-8. Este plásmido se usó como material de partida para generar el plásmido pSR660M1.

El plásmido pJET1.2/blunt (ThermoFisher Scientific) (Anexo 1, Figura A2) es un vector de clonación linearizado de selección positiva que permite clonar fragmentos de DNA con extremos romos y contiene un gen letal para la bacteria *E. coli*, la enzima de restricción Eco47I. Este gen letal se interrumpe cuando se liga un inserto en el sitio de clonación; y como resultado, solo las células bacterianas transformadas con plásmidos recombinantes pueden formar colonias. Este vector se empleó para clonar la secuencia 301gBlock (Anexo 2, Figura A4).

El plásmido pSR660M1 se construyó en el presente trabajo. Para la generación del vector pSR660M1, se insertaron 72 pb entre los codones 590 y 591 del gen *cap* de VAA-8 (número de codones relativos a la proteína VP1 de VAA-8, número de acceso GenBank: YP_077180.1) que se encuentra dentro del vector pSR660. La secuencia de 72 pb contiene una secuencia de restricción para la enzima SgfI que codifica para tres alaninas, una secuencia que codifica para tres glicinas, la secuencia que codifica para los aminoácidos del mimótopo del epítipo EDE1 (HSPLEKPVPHRS), una secuencia que codifica para tres glicinas, y finalmente, una secuencia de restricción para la enzima NotI que codifica para una alanina, una isoleucina y una

alanina. El procedimiento de la obtención del vector pSR660M1 se describe más adelante en 5.4.

5.2. Virus

Se emplearon los virus bacCap VAA-2, bacRep Cap 2/8, bacCapMod, ZikV y DenV-2. Los baculovirus recombinantes empleados en este trabajo derivan del nucleopoliedrovirus múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV) y fueron generados con el sistema Bac-to-Bac® (Invitrogen, Carlsbad, EUA).

El baculovirus recombinante bacCap VAA-2 fue obtenido previamente por miembros de nuestro grupo de investigación al emplear un plásmido donado por el Dr. Robert Kotin (NIH, EUA). Este baculovirus codifica para el gen *cap* de VAA-2, y se empleó para producir la cápside o PPV nativa de VAA-2 mediante el SCI-BV.

El baculovirus recombinante bacRep Cap 2/8 fue generado previamente por la M. en C. Laura Sevilla y se detalla en Sevilla (2018). Este baculovirus codifica para los genes *rep* de VAA-2 y *cap* de VAA-8, y se empleó para producir la cápside o PPV nativa de VAA-8 mediante el SCI-BV.

El baculovirus recombinante bacCapMod se construyó en el presente trabajo y el procedimiento de su obtención se detalla más adelante en 5.5. Este baculovirus codifica para el gen *rep* de VAA-2, y una modificación del gen *cap* de VAA-8, que contiene la inserción de una secuencia que codifica para 24 aminoácidos, incluyendo a la secuencia del mimótopo del epítipo EDE1. Este baculovirus se empleó para producir la cápside o PPV modificada de VAA-8 que despliega el mimótopo del epítipo EDE1, mediante el SCI-BV.

El stock de ZikV utilizado en este trabajo pertenece a la cepa africana MR-766 y fue donado por la Dra. Susana López del IBt-UNAM. Este virus fue amplificado en cultivos de células C6/36 sin SFB, titulado en células VERO E6 mediante la prueba de focos e inactivado por luz UV. ZikV inactivado se usó para sensibilizar placas de 96 pozos (Costar, Corning Inc.) para la prueba de ELISA.

El stock de DenV-2 usado en este trabajo pertenece a la cepa de referencia Nueva Guinea del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), esta cepa fue donada por la Dra. Victoria Pando del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). De igual manera que ZikV, este virus fue amplificado, titulado e inactivado; y se empleó para sensibilizar placas para la prueba de ELISA.

5.3. Líneas y cultivos celulares

Se emplearon las líneas celulares Sf9, C6/36 y VERO E6.

La línea celular Sf9 proviene de células de ovario de pupa de *Spodoptera frugiperda*. Estas células se utilizaron para la producción, el aislamiento, la amplificación y la titulación de baculovirus recombinantes; y para la producción de proteínas recombinantes VPs y PPV de VAA-2 y VAA-8. Esta línea se mantuvo en medio SF-900 II SFM (GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, EUA), y para la producción de proteína recombinante se empleó el medio PSFM (Wako, Japón). Los cultivos en adherencia se emplearon para la generación, el aislamiento y titulación de baculovirus; y para los primeros dos procesos, se efectuaron en placas de 6 pozos de fondo plano para cultivo celular (Costar, Corning Inc.), y para el último proceso, en placas de 96 pozos de fondo plano para cultivo celular (Nest Biotech Co., China). Los cultivos en suspensión se emplearon para la amplificación de baculovirus y la producción de proteína recombinante, en matraces de 250 mL, 500 mL, y 1 L, con volúmenes de trabajo de 50 mL, 150 mL y 250 mL, respectivamente, a 27 °C y 110 rpm. Los pases celulares se efectuaron a partir de cultivos en etapa exponencial con concentraciones celulares no mayores a 6×10^6 células/mL. Las células se subcultivaron a 0.8×10^6 células/mL. La concentración celular de estos cultivos se determinó utilizando el contador electrónico de partículas Coulter Multisizer II (Coulter Electronics Inc., EUA); y la viabilidad celular, mediante exclusión de azul de tripano y una cámara de Neubauer.

La línea celular C6/36 proviene de larvas de *Aedes albopictus*. Estas células se utilizaron para la amplificación de DenV-2 y ZikV. Esta línea se mantuvo en medio EMEM (ATCC®) con 5% de SFB, y se cultivó en adherencia en frascos T25, T75 y

T225, con volúmenes de trabajo de 6 mL, 15 mL y 50 mL, respectivamente, a 28 °C y 5% de CO₂. Los pases celulares se efectuaron a partir de cultivos de 72 horas o cuando estos estaban por encima del 90% de confluencia. El medio gastado fue retirado, se agregó medio nuevo y las células se despegaron con cell scrapers (Corning®); y se subcultivaron diluyendo 2 mL del cultivo confluyente de un frasco T25 en 4 mL de medio fresco para un frasco T25, diluyendo los 6 mL del cultivo confluyente de un frasco T25 en 9 mL de medio fresco para un frasco T75 o los 15 mL del cultivo confluyente de un frasco T75 en 35 mL de medio fresco para un frasco T225.

La línea celular VERO E6 proviene de células aisladas de epitelio de riñón de *Cercopithecus aethiops*. Estas células se usaron para la prueba de titulación de DenV-2 y ZikV. Esta línea se mantuvo en medio DMEM (Sigma-Aldrich) con 10% de SFB, y se cultivó en adherencia en frascos T25 y en placas de 96 pozos de fondo plano para cultivo celular, con volúmenes de trabajo de 6 mL y entre 100 a 140 µL por pozo, respectivamente, a 37 °C y 8% de CO₂. Los pases celulares se efectuaron a partir de cultivos por encima del 90% de confluencia. El medio gastado fue retirado, la monocapa se lavó con 3 mL de PBS 1X, se colocó 1 mL de tripsina al 0.2% y se incubó a 37 °C y 8% de CO₂ hasta que las células se despeguen del frasco T25, se agregaron 5 mL de medio nuevo; y se subcultivaron diluyendo 1.5 mL del cultivo confluyente de un frasco T25 en 4.5 mL de medio fresco para un frasco T25 o colocando 0.07 x 10⁶ células aproximadamente por pozo/100 µL del cultivo confluyente de un frasco T25 en cada pozo de las placas.

Todas las líneas celulares se monitorearon con el microscopio invertido de campo claro “Nikon Eclipse TE300”.

5.4. Construcción del plásmido pSR660M1

En primer lugar, se verificó la secuencia del gen *cap* y del promotor P₁₀ dentro del vector pSR660 (Anexo 2), y posteriormente, se procedió a construir el vector pSR660M1.

Para la construcción del vector pSR660M1, se mandó a sintetizar un fragmento de 301 pb de doble cadena con extremos romos (gBlocks® Gene Fragments, IDT), denominado 301 gBlock (Anexo 3, Figura A4), el cual contiene secuencias del vector pSR660, sitios de corte único para las enzimas KflI (isoesquizómero de SanDI) y XcmI, los cuales también están presentes en el vector pSR660 una sola vez, y 72 pb que incluyen a la secuencia del mimótopo del epítipo EDE1 y otros elementos que se detallaron en 5.1. Las secuencias del vector pSR660 presentes en el fragmento 301 gBlock forman parte de otras estrategias basadas en el método “Gibson Assembly” que se llevaron a cabo, pero no funcionaron para la construcción del vector pSR660M1 (datos no mostrados).

El fragmento 301 gBlock se clonó en el vector pJET1.2/blunt, se transformaron células quimiocompetentes *E. coli* One Shot™ TOP10 (ThermoFisher Scientific) y se sembraron en cajas Petri con medio agar LB con 100 µg/mL de ampicilina. Las cajas se incubaron durante 12-14 horas a 37 °C. Se tomaron tres colonias aisladas y se inocularon en medio LB con 100 µg/mL de ampicilina y se dejaron incubando durante 12-14 horas a 37 °C y 250 rpm. Se purificó el DNA plasmídico de las tres colonias con el kit “Zippy™ Plasmid Miniprep Kit” (Zymo Research); y finalmente la clonación se verificó a través de una reacción de restricción con la enzima PvuI (New England Biolabs), la cual se llevó a cabo durante 25 minutos a 37 °C, y los productos de la reacción se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

Para amplificar la secuencia 301 gBlock clonada en el vector pJET1.2/blunt, se diseñaron y se mandaron a sintetizar los oligonucleótidos mostrados en la tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para la amplificación del fragmento 301 gBlock y longitud de amplicón esperado.

Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Tamaño esperado del amplicón (pb)
FgB	GGTGG AAGTTGCCGTCCGTG	301
RgB	TACAGCGATGTCATGCTCACCA	

La PCR, para la amplificación del 301 gBlock, se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl; se emplearon 2.5 µl de oligonucleótidos (10 µM), 10 µl del buffer de la enzima Phusion DNA polimerasa (5X), 1 µl de dNTPs (10 mM), 0.4 µl de la enzima Phusion DNA polimerasa (2U/µl) (New England Biolabs), 1 ng del DNA molde y agua. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 20 segundos a 98 °C; 35 ciclos de 20 segundos a 98 °C, 15 segundos a 62 °C (con relación a la Tm), 8 segundos a 72 °C; y 1 minuto a 72 °C para la extensión final. En esta ocasión se empleó una DNA polimerasa de alta fidelidad para evitar obtener mutaciones en los productos de PCR.

Posteriormente, el plásmido pSR660 y el amplicón del fragmento 301 gBlock se digirieron con las enzimas XcmI (New England Biolabs) y KfII (ThermoFisher Scientific) durante 3 horas a 37 °C para cada enzima. La actividad de ambas enzimas se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa (Anexo 4, Figura A5).

Los productos de la digestión del vector pSR660 digerido con ambas enzimas se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y se purificó la banda del tamaño esperado con el “GeneJET Gel Extraction Kit” (ThermoFisher). La ligación entre los productos digeridos del vector pSR660 y el fragmento 301 gBlock se realizó con la enzima T4 DNA ligasa (ThermoFisher Scientific). Posteriormente, de igual forma que se realizó para el vector pJET1.2/blunt, se transformaron células quimiocompetentes *E. coli* One Shot™ TOP10 con la ligación. Se evaluaron 6 colonias por patrón de restricción con la enzima PvuI (New England Biolabs), la reacción de digestión se llevó a cabo durante 30 minutos a 37 °C, y los productos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Luego, se diseñaron y se mandaron a sintetizar oligonucleótidos para secuenciar colonias candidatas (tabla 2); y finalmente, se mandaron a secuenciar los plásmidos de 2 colonias.

Tabla 2. Oligonucleótidos usados para verificar la construcción del vector pSR660M1 mediante secuenciación.

Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')
F1Cap	CCGCAGAGACCAAAGTTCAACTGA
R1Cap	GGAGGCACGGCAAATACGCA

El diseño de oligonucleótidos, la selección de las temperaturas de hibridación y la determinación de las proporciones de ligación se llevaron a cabo con las herramientas “OligoAnalyzer” (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>), “Tm Calculator” (<https://tmcalculator.neb.com/#!/main>), y “NEBioCalculator” (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>). La elección de las enzimas de restricción y la determinación de los patrones esperados, y la determinación de los amplicones esperados en las PCR se realizó mediante un análisis *in silico* con el software “SnapGene™ 1.1.3”.

5.5. Producción del baculovirus recombinante bacCapMod

El baculovirus recombinante bacCapMod fue generado siguiendo el flujo de trabajo del sistema Bac-to-Bac de Invitrogen descrito en 2.6.

5.5.1. Generación del báculo recombinante

Células quimiocompetentes *E. coli* DH10Bac™ se transformaron con 1 µg del plásmido pSR660M1. La transformación se incubó durante 5 horas a 37 °C y 200 rpm en medio SOC. Luego, se sembraron 100, 200 y 400 µl en cajas Petri con agar LB con kanamicina (50 µg/mL), gentamicina (7 µg/mL), tetraciclina (10 µg/mL), a las cuales se les había dispersado 50 µL de X-gal (40 mg/mL) /IPTG (50 mg/mL) sobre la superficie del agar, y se incubaron de 24 a 48 horas a 37 °C.

En este tiempo se distinguieron dos fenotipos, colonias blancas y colonias azules, esto debido a que la recombinación, que ocurre entre el vector pSR660M1 y el báculo en las regiones Tn7, interrumpe la secuencia codificante de la enzima β-galactosidasa en el báculo, la cual hidroliza X-gal produciendo galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol, el segundo al oxidarse produce una coloración azul; por lo tanto, las colonias azules serán no recombinantes y las blancas serán las recombinantes. Se seleccionaron colonias candidatas para reestriarlas. Luego de 48 horas se seleccionaron tres colonias candidatas y se inocularon en medio LB con

los mismos antibióticos usados en las cajas Petri con agar y se dejaron incubando durante 12-14 horas a 37 °C y 250 rpm, luego se les extrajo el báculo mediante lisis alcalina con reactivos de la marca Qiagen. Para ello, el cultivo se centrifugó a 13000 g por 15 minutos a 4 °C, se resuspendió en 300 µL de buffer P1 Qiagen®, se añadieron 300 µL de buffer P2 Qiagen® y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos, lentamente se añadieron 300 µL de buffer P3 Qiagen® y se incubó en hielo por 10 minutos, se centrifugó a 13000 g por 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a otro tubo que contenía 0.8 mL de isopropanol frío, se mezcló suavemente y se incubó por 10 minutos a 4 °C. Después, se centrifugó a 13000 g por 15 minutos a 4 °C, se desechó el sobrenadante y se hicieron 2 lavados del pellet con etanol al 70% y centrifugando a 13000 g. Los pellets se dejaron secando a temperatura ambiente, luego se resuspendieron en 40 µL de agua estéril, se les agregó un volumen igual de cloroformo, se mezclaron con la micropipeta, se centrifugó a 13000 g por 5 minutos a 5 °C y se extrajo la fase acuosa, la cual contiene los ácidos nucleicos, y finalmente, se almacenó a 4 °C.

Para confirmar la obtención del báculo recombinante que contiene el inserto de interés, se diseñó y mandó a sintetizar el oligonucleótido R1_M1, y se emplearon otros que fueron previamente diseñados por miembros de nuestro grupo de investigación (tabla 3).

La generación del báculo recombinante se verificó mediante tres PCR, con los oligonucleótidos de la tabla 3. Las PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µl; se emplearon 1 µl de oligonucleótidos (10 µM), 4 µl del buffer de la enzima Phusion DNA polimerasa (5X), 0.4 µl de dNTPs (10 mM), 0.2 µl de la enzima Phusion DNA polimerasa (2U/µl), 2 ng del DNA molde y agua. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 30 segundos a 98 °C; 35 ciclos de 10 segundos a 98 °C, 20 segundos a 60 °C (con relación a la Tm), 1 minuto y 15 segundos o 3 minutos y 24 segundos a 72 °C, dependiendo de los oligonucleótidos empleados (tabla 3); y 5 minutos a 72 °C para la extensión final. Los productos de la reacción se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. En esta ocasión se empleó la Phusion DNA polimerasa porque puede amplificar fragmentos grandes o a partir de genomas grandes como el báculo (>135 kb) con mayor probabilidad en

comparación a DNA polimerasas de baja fidelidad. Como controles se usaron un b acmido recombinante donado por la M. en C. Jocelyn Uribe de nuestro grupo de investigación (IBt-UNAM) y una colonia azul del presente trabajo.

Tabla 3. Oligonucle otidos usados para verificar la presencia del inserto de inter es en el b acmido, amplicones esperados, temperaturas de hibridación y tiempos de extensión.

Oligonucle�otido	Secuencia (5'→3')	Tamaño esperado del amplicón (kb)	Temperatura de hibridación (�C)	Tiempo de extensión en los 35 ciclos
FM13	CCCAGTCACGAC GTTGTAAAACG	2.4	65	1 minuto y 15 segundos
R1_M1	CCGCAGGTGGAG GTCATT			
FPolh	AAATGATAACCAT CTCGCA	2.7	58	1 minuto y 15 segundos
RM13	AGCGGATAACAA TTTCACACAGG			
FM13	CCCAGTCACGAC GTTGTAAAACG	6.7	64	3 minutos y 24 segundos
RM13	AGCGGATAACAA TTTCACACAGG			

Los pares FM13-R1_M1 y FPolh-RM13 hibridan en regiones que flanquean a los sitios de transposición Tn7 en el b acmido y en regiones presentes en el inserto de inter es, de esta manera permiten determinar si la recombinación se dio en el sentido adecuado para que se puedan traducir los genes de inter es. El par FM13-RM13 hibrida en regiones que flanquean a cada uno de los sitios de transposición Tn7 y permite determinar si todo el inserto de inter es se recombin o en el b acmido. Se debe mencionar que el par FM13-RM13 amplifica un fragmento de 300 pb en los b acmidos no recombinantes.

Para el diseño de oligonucle otidos, cálculo de temperatura de hibridación y determinación de los amplicones esperados se usaron las mismas herramientas descritas en 5.4.

5.5.2. Transfección de células Sf9

Se colocaron 8×10^5 células Sf9 en placas de seis pozos Corning® y se incubaron 1 hora en 1 mL de medio SF-900 II SFM para su adherencia. Mientras tanto, se resuspendieron 1 µg y 2 µg del báculo recombinante generado con pSR660M1 en 5.5.1, y 1 µg de un báculo recombinante que codifica para las proteínas fluorescentes eGFP y RFP en 100 µL de medio Grace's 1X por separado, el último báculo se empleó como control de transfección y fue donado por el Lic. Enrique Paz de nuestro grupo de investigación. Por otro lado, para cada resuspensión de báculo se diluyeron 8 µL de FlyFectin™ (lípidio catiónico) en 100 µL de medio Grace's 1X y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se mezclaron el DNA diluido y FlyFectin™ diluida y se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos. Se agregaron los aproximadamente 210 µL de la mezcla DNA-lípido por goteo a las células sf9 y se incubó la placa de seis pozos protegida de la luz en un agitador de vaivén durante 7 horas. Luego, se removió el medio de las células y se agregaron 2 mL de medio SF-900 II con 20 µL de antibiótico/antimicótico 100X. En total se realizaron tres transfecciones: la primera con 1 µg de báculo recombinante generado con pSR660M1, la segunda con 2 µg de báculo recombinante generado con pSR660M1, y la tercera con un báculo que presenta los genes para eGFP y RFP. La placa de seis pozos se incubó 120 horas a 27 °C sin agitación en ambiente húmedo. Después de las 120 horas se observó la fluorescencia en unas cuantas células del control. La fluorescencia en el control se observó a través de un microscopio invertido Nikon Eclipse TE300 acoplado a un detector CCD (Qi1MC, Nikon), la proteína fluorescente eGFP se observó con el canal verde y la proteína RFP en el canal rojo. Después de las 120 horas, el sobrenadante fue recolectado y se le agregó SFB a una concentración final de 1% y se almacenó a 4 °C, a esta primera coleta se le denominó primera generación de baculovirus. Se agregaron 2 mL de medio SF-900 II SFM a cada pozo y se dejaron incubando por 96 horas más a 27 °C sin agitación en ambiente húmedo. Luego de las 96 horas se volvió a observar la fluorescencia en el control, pero esta vez aumentaron las células que emitían fluorescencia. Se despegaron las células de las tres transfecciones mediante pulsos de líquido con el mismo medio de los

pozos, se recolectó todo el medio y se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Al sobrenadante se le agregó SFB a una concentración final del 1% y se almacenó a 4°C, a esta colecta se le denominó segunda generación de baculovirus, y el pellet se almacenó a -20 °C.

Con la finalidad de verificar la producción del baculovirus recombinante bacCapMod y de detectar la expresión de las proteínas VPs modificadas, los sobrenadantes de la segunda generación y los pellets colectados se evaluaron mediante la técnica de Western blot, la cual se detalla más adelante en 5.7. Para evaluar la producción de proteínas recombinantes, el sobrenadante se concentró 10 veces, y el pellet celular se resuspendió en 200 µL de PBS 1X; mientras que para determinar la presencia de baculovirus, se empleó el sobrenadante sin concentrar. El volumen cargado por pozo fue de 20 µL, para esto se mezclaron 15 µL de sobrenadante sin concentrar o sobrenadante concentrado o del pellet celular resuspendido con 5 µL de buffer de carga 4X, y se realizó el Western blot empleando el AcM AcV5 para el baculovirus o el AcM B1 para las VPs de VAA. Como controles negativos se emplearon sobrenadante y pellet celular de cultivo de células Sf9 sin transfectar; y como controles positivos, al baculovirus Rep Cap 2/8, y a la proteína VP3 de VAA-2, esta última donada por el M. en C. David Moreno de nuestro grupo de investigación.

La estimación del peso de las proteínas VPs modificadas se calculó con la ayuda de la herramienta "ProtParam tool" (<https://web.expasy.org/protparam/>).

5.5.3. Ensayo en placa para aislamiento de placas virales y selección de baculovirus para generar stock viral

El segundo sobrenadante colectado o segunda generación de baculovirus de la transfección con 1 µg de bÁcmido se utilizó para realizar el ensayo en placa.

Se colocaron 1.5×10^6 células por pozo en una placa de seis pozos, diluidas en medio Grace's 1X y con un volumen final de 2 mL por pozo, y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente para su adherencia. Se prepararon diluciones seriadas de 10^{-1} hasta 10^{-5} del baculovirus en medio Grace's 1X sin SFB, se retiraron los 2

mL de medio de las células Sf9 adheridas, y, éstas se incubaron con 900 μ L de cada dilución viral por 4 horas a temperatura ambiente; un pozo se usó como control y no se infectó con virus. Posteriormente, se retiró el medio y se agregó 3 mL de medio de plaqueo (agarosa de bajo punto de fusión al 4%, medio Grace's 2X, SFB, en una relación de 1:0.8:0.2, respectivamente) a una temperatura de 37 °C. La placa se incubó por 96 horas a 27 °C en ambiente húmedo. Posteriormente se adicionó 2 mL de una segunda capa de medio de plaqueo con rojo neutro (agarosa de bajo punto de fusión al 1.2%, agua estéril, rojo neutro al 1%, en una relación de 1:1:0.25, respectivamente). La placa se incubó 16 horas en ambiente húmedo a 27 °C. Luego del tiempo de incubación, se procedió a la selección de placas virales, éstas se colectaron y resuspendieron en 900 μ l de medio Grace's 1X.

Con el fin de seleccionar la placa viral para producir el stock viral, se colocaron 1.8×10^6 células por pozo en una placa de 6 pozos, diluidas en medio Grace's 1X y con un volumen final de 2 mL por pozo, y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente para su adherencia. Posteriormente se retiró el medio y las células se incubaron durante 4 horas con las placas seleccionadas. Se adicionaron 2 mL de medio SF-900 II SFM a cada pozo y se incubaron durante 96 horas a 27 °C en ambiente húmedo. Finalmente, el pellet y el sobrenadante se recolectaron para su análisis de expresión de proteína recombinante a través de Western blot y para la amplificación del stock viral, respectivamente.

Para el Western blot a partir de muestras de pellet se procedió de igual manera que en 5.5.2.

5.5.4. Amplificación de stocks de baculovirus

Una vez que se tuvo identificado al baculovirus que mostró el mayor efecto citopático y/o que fue capaz de generar la mayor cantidad de proteína recombinante (VPs modificadas) a partir del análisis de las placas aisladas; se procedió con la amplificación del stock del baculovirus recombinante denominado bacCapMod. Ésta se llevó a cabo en cultivos de células Sf9 en fase exponencial y a una viabilidad mayor al 95% en medio SF900-II SFM a una concentración de 1×10^6 células/mL

infectadas con 500 μL de sobrenadante del cultivo de la placa seleccionada en un volumen de trabajo de 50 mL a 27 °C y 110 rpm. Después de 96 horas post infección (hpi) o cuando la viabilidad celular estaba entre 20-30%, el stock de baculovirus recombinante, también denominado pase 1, se recuperó del sobrenadante tras centrifugar a 1000 g por 15 minutos a 4 °C, y este sobrenadante se almacenó a 4 °C en 1% de SFB y protegido de la luz. Posteriormente, se amplificó el pase 2 del baculovirus bacCapMod, mediante la infección de cultivos de células Sf9 a una concentración de 1×10^6 células/mL y una multiplicidad de infección (MDI) de 0.1 UFP/célula.

Los baculovirus bacCap VAA-2 y bacRep Cap 2/8 empleados en este trabajo, se amplificaron con la misma metodología que se siguió para el baculovirus bacCapMod.

5.5.5. Titulación de baculovirus

La titulación de los baculovirus recombinantes bacCap VAA-2, bacRep Cap 2/8 y bacCapMod se realizó siguiendo la metodología de Mena *et al.* (2003). En dos placas de 96 pozos se sembraron 50 μL /pozo de células Sf9 a una concentración de 0.18×10^6 células/mL en medio SF900-II SFM. Se prepararon diluciones seriadas de 10^0 a 10^{-10} del stock viral a titular y se agregaron 10 μL / pozo, usando 16 pozos por dilución y 16 pozos como control negativo a los que se les adicionó sólo medio de cultivo. Las cajas se incubaron durante 6 días a 27 °C en ambiente húmedo. Al término del periodo de incubación, se agregaron 10 μL /pozo de una disolución (5 mg/mL) de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tatrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, St, Louis, EUA). Las placas se incubaron en obscuridad durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación orbital, luego se centrifugaron durante 10 minutos a 2000 rpm. Los cristales de formazan formados, que son producto de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial sobre el MTT, fueron solubilizados usando 50 μL /pozo de dimetil sulfóxido (DMSO). Se midió la absorbancia a 570 nm usando un lector de microplacas (FLUOstar Omega, BMG Labtech). Los datos de absorbancia y dilución viral se ajustaron a un modelo sigmoide logístico de cuatro

parámetros (Ecuación 1), usando el programa Sigmaplot 10.0 (SPSS, Chicago IL, USA).

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

En esta ecuación, Y representa la absorbancia, X, la dilución del stock viral, Y₀, la absorbancia mínima (que corresponde a la viabilidad mínima detectada), a es la absorbancia máxima, b es la pendiente de la curva y X₀ es la dilución a la cual la respuesta fue del 50%. Introduciendo el valor de X₀ en la ecuación 2, se calculó la dosis letal media del stock viral (TCLD₅₀/mL). El valor de X₀ se sustituye en la ecuación 2 con valor negativo y se obtiene el inverso del logaritmo y se divide entre el volumen de virus empleado en cada dilución (0.01 mL) para obtener el valor de TCLD₅₀/mL. Este valor se sustituye en la ecuación 3 para obtener TCID₅₀/mL. Finalmente, para obtener el valor de UFP/mL se sustituye TCID₅₀/mL en la ecuación 4.

Ecuación 2: $TCLD_{50}/mL = 1/((10^{-X_0})/0.01 \text{ mL})$

Ecuación 3: $\log TCID_{50}/mL = 0.912 (\log TCLD_{50}/mL) + 1.674$

Ecuación 4: $UFP/mL = TCID_{50}/mL \times 0.69$

5.6. Cuantificación de proteína total

La cuantificación de proteína total de todas las muestras se determinó mediante el método de Bradford en placa de 96 pozos (Nest Biotech Co., China). En cada pozo se colocaron 150 µL de muestra diluida 1:10 o 1:50 en agua milli Q, y se le agregó 50 µL reactivo de Bradford (Bio-Rad). Se utilizó una curva estándar de albúmina de suero bovino, en un rango de 5 a 80 µg/mL. Cada estándar y muestra se analizaron por triplicado. Las muestras se incubaron 5 minutos protegidas de la luz y posteriormente se determinó la absorbancia a 595 nm en el lector de microplacas FLUOstar Omega.

5.7. SDS-PAGE y Western blot

Para visualizar las proteínas presentes en una muestra y, en algunos casos, determinar la pureza de ésta, se empleó la técnica SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie o con nitrato de plata; y principalmente, para comprobar la presencia de una determinada proteína se usó la técnica Western blot.

Se evaluaron muestras de sobrenadante de cultivo celular, de pellet celular, purificadas y concentradas. La evaluación y comparación entre muestras se hizo con la misma cantidad de proteína total, con el mismo volumen de muestra o con el mismo número de células viables. En cada evaluación por SDS-PAGE y Western blot, se especifica la cantidad de muestra analizada y como se trató cada muestra, así como también que controles se emplearon.

Cada muestra se mezcló con buffer de carga desnaturante y reductor 4X (glicerol 20%, SDS 5%, Tris-HCl 100 mM pH 6.8, β -mercaptoetanol 1%, azul de bromofenol 0.004%), y la mezcla se incubó 10 minutos a 99 °C. Para el SDS-PAGE, las muestras se cargaron en geles de acrilamida al 12% en condiciones desnaturantes y reductoras utilizando buffer de corrida Tris-glicina-SDS (Tris base 24.8 mM, glicina 0.192 mM, EDTA 2 mM, SDS 0.1%, pH 8.8). Los geles se tiñeron o se sometieron a electrotransferencia, en el caso de la técnica Western blot. La electrotransferencia se hizo usando membranas de PVDF (Millipore) previamente activadas con metanol, en un sistema semiseco Owl™ (ThermoFisher Scientific), utilizando buffer de transferencia (glicina 38.63 mM, tris base 47.88 mM, SDS 0.037%, metanol 20%) y aplicando un amperaje constante de 40 mA durante 1 hora para cada gel. El bloqueo se realizó incubando la membrana de PDVF con leche descremada al 5% en buffer TBS (NaCl 72.31 mM, Tris-HCl 7.61 mM, pH 7.5) con Tween 20 al 0.1% (TBST), durante toda la noche a 4 °C. Se realizaron 3 lavados con buffer TBST por 10 minutos cada uno. Luego las membranas se incubaron en presencia del anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación, se realizaron 3 lavados con TBST de 10 minutos cada uno. Posteriormente la membrana se incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario. Se realizaron tres lavados y finalmente se hizo el revelado con luminol (Millipore). Las imágenes de los geles y membranas se capturaron con el fotodocumentador

ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), y los análisis de las imágenes fueron realizados con el software Image Lab™ 6.0.1 de Bio-Rad.

Como anticuerpos primarios se emplearon el anticuerpo monoclonal (AcM) B1 (Progen Biotechnik, Cat. 61058) a una dilución 1:1000 para detectar las proteínas VP1, VP2 y VP3 de VAA, un anticuerpo policlonal (Progen Biotechnik, Cat. 61084) a una dilución 1:1000 para detectar las proteínas VP1, VP2 y VP3 de VAA, el AcM A1 (Progen Biotechnik, Cat. 61056) a una dilución 1:1000 para detectar la proteína VP1 de VAA, el AcM A69 (Progen Biotechnik, Cat. 61057) a una dilución 1:1000 para detectar las proteínas VP1 y VP2 de VAA y el AcM AcV5 (eBioscience, Cat. 14-6995-81) a una dilución 1:3000 para detectar la proteína GP64 del baculovirus. Como anticuerpos secundarios se emplearon un anticuerpo monoclonal anti-IgG de ratón conjugado a una peroxidasa y diluido 1:5000 para los anticuerpos primarios B1, A1, A69 y AcV5; y un anticuerpo monoclonal anti-IgG de conejo conjugado a una peroxidasa y diluido 1:5000, para el anticuerpo primario policlonal. Los anticuerpos se diluyeron en TBST.

5.8. Dot blot

La técnica de Dot blot se empleó para detectar partículas pseudovirales de VAA (VPs ensambladas en capsómeros/cápsides), partículas virales de ZikV y el mimótipo del epítipo EDE1 de ZikV. Se evaluaron muestras de sobrenadante de cultivo celular, pellet celular lisado/clarificado, purificadas y concentradas. La evaluación y comparación entre muestras se hizo por la misma cantidad de proteína total o por el mismo volumen de muestra; en cada evaluación de Dot blot se especifica la cantidad de muestra analizada y como se trató cada muestra, así como también que controles se emplearon.

La membrana de PVDF fue activada siguiendo el mismo procedimiento empleado para Western blot. Luego, la membrana se montó en un equipo Bio-Dot (BioRad) conectado a una bomba de vacío y se adicionaron a cada pozo entre 100 a 300 µL de cada muestra con diferentes cantidades de proteína total. Las muestras se inmovilizaron en la membrana con ayuda de vacío. Posteriormente la membrana se

bloqueó con leche descremada al 5% en TBST, durante toda la noche a 4 °C, y se procedió de igual manera como en el procedimiento descrito para la técnica Western blot, hasta revelar la membrana y capturar las imágenes.

Como anticuerpos primarios se emplearon el AcM A20 (Progen Biotechnik, Cat. 61055) a una dilución 1:1000 para detectar ensamblados proteicos de las proteínas VPs de VAA-2, el AcM ADK8 (Progen Biotechnik, Cat. 651160) a una dilución 1:3000 para detectar ensamblados proteicos de las proteínas VPs de VAA-8 y el AcM EDE1-C8 (260 µg/mL), que es producido en nuestro grupo de investigación por la M. en C. Esmeralda Cuevas, a una dilución 1:6000 para detectar el epítipo conformacional EDE1 en partículas virales de DenV o ZikV o el mimótopo del epítipo EDE1 desplegado en las proteínas VPs modificadas de VAA-8. Como anticuerpos secundarios se emplearon un anticuerpo monoclonal anti-IgG de ratón conjugado a una peroxidasa y diluido 1:5000 para los anticuerpos primarios A20 y ADK8; y un anticuerpo monoclonal anti-IgG de humano conjugado a una peroxidasa y diluido 1:5000 para el anticuerpo primario EDE1-C8. Los anticuerpos se diluyeron en TBST.

5.9. Producción, purificación y caracterización de cápsides de VAA-8

En esta sección se describe la producción, purificación y caracterización de las cápsides o PPV modificadas de VAA-8, así como también, la producción de los controles de cápsides o proteínas VPs nativas de VAA-2 y de VAA-8; esto con el fin de determinar el despliegue del mimótopo en la cápside de VAA-8, y obtener PPV modificadas para inmunizar ratones.

5.9.1. Producción y extracción de cápsides

Cultivos celulares de Sf9 a una concentración entre $1.5-2 \times 10^6$ células viables/mL en medio SF900-II SFM, con un volumen de trabajo de 250 mL, se infectaron con el baculovirus bacCap VAA-2, bacRep Cap 2/8 o bacCapMod, empleando una MDI de

5 UFP/célula. Estos cultivos se mantuvieron a 27 °C y 110 rpm, y se cosecharon entre las 60-72 hpi cuando la viabilidad celular se encontraba entre 40-60%. Los cultivos celulares se centrifugaron a 1000 g por 15 minutos y 4 °C, y el pellet celular se almacenó a -20 °C o se sometió inmediatamente al proceso de extracción de cápsides/VPs.

Para la extracción de cápsides, se utilizó el método reportado por Chahal *et al.* (2007). Para esto, el pellet celular se solubilizó en buffer de lisis (Tris base 50 mM, MgCl₂ 2 mM pH 7.5, Benzonasa 50 U/mL de buffer de lisis) a una relación de 1 mL de buffer de lisis por cada 10 x 10⁶ células viables en el pellet. El pellet solubilizado se incubó 30 minutos a temperatura ambiente en agitación y posteriormente se añadió 1:10 volúmenes de MgSO₄ 375 mM para alcanzar una concentración final de 37.5 mM y se incubó nuevamente por 30 minutos a temperatura ambiente, luego se realizaron 3 ciclos de congelado/descongelado con hielo seco y baño María a 37 °C, se centrifugó a 3500 g por 20 minutos a 4 °C y el sobrenadante se filtró a través de membranas de 0.45 µm y se almacenó a -20 °C o se sometió inmediatamente al proceso de purificación. A este sobrenadante filtrado lo denominamos clarificado.

La producción de cápsides y el despliegue del mimótopo del epítipo EDE1 de DenV y ZikV se evaluó en el clarificado mediante la técnica Dot blot. Para detectar cápsides de VAA-8 se usó el AcM ADK8, y para detectar el despliegue del mimótopo se empleó el AcM EDE1-C8. Además, como AcM control se empleó a A20; y como controles negativos para A20 se usaron AAP y VP3 de VAA-2; como control negativo para ADK8 se empleó a AAP de VAA-2; y como control negativo y control positivo para EDE1-C8 se empleó a AAP de VAA-2 y a ZikV, respectivamente. Al igual que VP3, AAP de VAA-2 fue donado por el M. en C. David Moreno de nuestro grupo de investigación, y el stock de ZikV usado en este análisis se produjo en el presente trabajo y su proceso de obtención se detalla en 5.10. Para todas las muestras, por pozo se cargaron 10 µg o 20 µg de proteína total, excepto en el caso de ZikV, se cargó 12 o 25 µL de sobrenadante de cultivo. Antes de cargarse en el los pozos, las muestras fueron diluidas en PBS 1X a un volumen final de 100 µL para facilitar su manejo.

5.9.2. Evaluación de proteólisis de las proteínas VPs

La evaluación de la proteólisis de proteínas VPs modificadas de VAA-8 por la inserción de la secuencia de 24 aa se realizó en pellet celular resuspendido en PBS 1X como en 5.5.2 y en clarificado de pellet celular obtenido mediante el procedimiento de extracción descrito en 5.9.1. Además, se evaluaron y compararon las producciones realizadas con el pase 1 y el pase 2 de bacCapMod. El mapeo de la proteólisis en las proteínas VP1, VP2 y VP3 se realizó mediante la técnica Western blot, y los AcM A1, A69 y B1, y un anticuerpo policlonal. Como control negativo para el Western blot, se empleó la proteína hemaglutinina del virus de la influenza, la cual se produjo de manera recombinante en el SCI-BV, ésta fue donada por el Ing. Alberto Porras de nuestro grupo de investigación; y como controles de proteínas VPs nativas, se emplearon las de VAA-2 y de VAA-8. La cantidad de las muestras evaluadas sin someterse al procedimiento de extracción que se cargaron en los pocillos del gel se normalizaron mediante proteína correspondiente al mismo número de células viables. Por otro lado, para las muestras obtenidas con el procedimiento de extracción, es decir, clarificados, se cargaron 10 µg de proteína total en los pocillos del gel; de igual manera, se cargó 10 µg del control negativo.

Además, con “PeptideCutter” (https://web.expasy.org/peptide_cutter/) se pudo identificar sitios de corte de proteasas dentro los 24 aa insertados en las VPs de VAA-8; también, se revisó la base de datos “MEROPS” (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>) para identificar las proteasas codificadas por las células Sf9 y por el baculovirus. Y para estimar el peso de los productos de proteólisis de las VPs, se empleó la herramienta ProtParam tool.

5.9.3. Purificación de cápsides de VAA por gradiente de iodixanol

En el presente trabajo, para la purificación de cápsides de VAA, se emplearon los métodos de centrifugación en gradiente de densidad de iodixanol (Zolotukhin *et al.*, 1999), cromatografía de exclusión estérica (Marichal-Gallardo *et al.*, 2017) y cromatografía de afinidad (Uribe, 2020). El método de gradiente de iodixanol se

detalla a continuación, mientras que las metodologías de los procesos de cromatografía se muestran de manera resumida en el anexo 6.

Clarificados obtenidos en el proceso de extracción de cápsides se sometieron al proceso de purificación por gradiente de iodixanol (OptiPrep™, Sigma-Aldrich) para obtener cápsides nativas y modificadas puras de VAA-8.

Para la purificación de cápsides nativas y modificadas, se utilizó la metodología reportada por Zolotukhin *et al.* (1999). Se utilizó un gradiente discontinuo de iodixanol (15, 25, 40 y 60%) en PBS 1X con MgCl₂ 1 mM y KCl 2.5 mM (PBS-MK), y en el caso del iodixanol al 15%, además se incluyó NaCl 1M.

Inicialmente para las cápsides nativas, se utilizaron tubos Ultra-Clear de 38 mL de capacidad nominal (Beckman, Cat. 344058), y en ellos se colocaron 2.92 mL de iodixanol al 60%, 4.87 mL de iodixanol al 40%, 5.85 mL de iodixanol al 25%, 8.77 mL de iodixanol al 15% y 15.59 mL de clarificado (muestra). Las proporciones de iodixanol empleadas en comparación a las descritas por Zolotukhin *et al.* (1999), varían para la fracción del 60% y en la cantidad de muestra. Luego de armar los gradientes, los tubos se centrifugaron a 26000 rpm (89454 g) por 8 horas y 42 minutos a 8 °C utilizando el rotor SW28 en una ultracentrífuga Optima XPN-100 (Beckman). Una vez terminada la centrifugación se recolectaron las distintas fracciones (fases e interfaces). Las muestras se almacenaron a -20 °C, y posteriormente, se analizaron por medio de SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie, Western blot, Dot blot y microscopía electrónica de transmisión (MET). Para el SDS-PAGE y el Western blot y el AcM B1, se cargó un volumen de 15 µL de cada fracción mezclado con 5 µL del buffer de carga 4X, por pozo. Para el Dot blot, se cargó 100 µl de cada fracción colectada.

Para la purificación de cápsides modificadas, primero se evaluaron más variantes en las proporciones de iodixanol empleadas por Zolotukhin *et al.* (1999). La elección de las variantes se basó en el trabajo de Buclez *et al.* (2016). Para estas evaluaciones, se emplearon tubos Ultra-Clear de 14 mL de capacidad nominal (Beckman, Cat. 344060). Las cantidades de cada porcentaje de iodixanol empleado y de muestra colocadas en los tubos se muestran en la tabla 4. Los tubos se

centrifugaron a 36000 rpm (163659 g) por 5 horas 11 minutos a 8 °C, utilizando el rotor SW40 Ti en una ultracentrífuga Optima XPN-100. Una vez terminada la centrifugación, se recolectaron las distintas fracciones (fases e interfases). Las muestras se almacenaron a -20 °C, y posteriormente, se analizaron por medio de SDS-PAGE y tinción con nitrato de plata, Western blot con los AcM B1 y AcV5, y MET. Para el SDS-PAGE y el Western blot, se cargó un volumen de 12 µL de cada fracción mezclado con 4 µL del buffer de carga 4X, por pozo.

Tabla 4. Variantes en las proporciones de iodixanol empleadas para el gradiente discontinuo en la purificación de las cápsides modificadas de virus adeno-asociado del serotipo 8.

		Variantes					
Tubos		1	2	3	4	5	6
Denominación		Palomares	Zolotukhin	Buclez	Nueva 1	Nueva 2	Nueva 3
Iodixanol (mL)	Total (mL)	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
	Muestra (mL)	1.14	5.13	9.62	9.62	8.66	8.18
	15%	3.41	2.88	-	0.96	0.96	1.44
	25%	3.41	1.92	0.96	1.28	0.96	0.96
	40%	2.27	1.60	1.28	0.64	1.28	1.28
	60%	2.27	0.96	0.64	-	0.64	0.64

Las proporciones de la variante Palomares fueron evaluadas previamente por la Dra. Laura Palomares, investigadora principal de nuestro grupo de investigación; las proporciones de la variante Zolotukhin corresponde a las empleadas para las cápsides nativas de VAA-8 en el presente trabajo; las proporciones de la variante Buclez fueron tomadas de Buclez *et al.* (2016); y las proporciones de las variantes Nueva 1, 2 y 3 se basaron en modificaciones de la variante Buclez.

Después de determinar qué variante permitió recuperar y purificar las cápsides modificadas de VAA-8, se determinó la densidad de dichas cápsides siguiendo el protocolo descrito en las hojas de aplicaciones de OptiPrep™. Para esto, se construyó una curva estándar, se hicieron diluciones 1:4 de cada % de iodixanol usado en el gradiente, así como también de la fracción en la que se encontraron las cápsides modificadas, las diluciones se hicieron con PBS-MK y en un volumen final de 200 µL. Los estándares y la muestra se evaluaron por triplicado en una placa de 96 pozos a través de absorbancia a 340 nm en el lector FLUOstar Omega. Finalmente, para determinar la densidad, se reemplazó el valor calculado de % de iodixanol para la fracción de las cápsides modificadas en la ecuación 5.

Ecuación 5: Densidad (g/mL) = 0.005 (concentración de iodixanol, %) + 1

Luego, se procedió a purificar en tubos Ultra-Clear de 38 mL de capacidad nominal para obtener mayor cantidad de cápsides modificadas purificadas; para esto, las proporciones de cada fracción del gradiente de la variante elegida se mantuvieron para alcanzar un volumen final de 38 mL (1.95 mL de iodixanol al 60%, 3.89 mL de iodixanol al 40%, 2.92 mL de iodixanol al 25%, 2.92 mL de iodixanol al 15% y 26.33 mL de clarificado). Las condiciones de centrifugación fueron las mismas que se usaron para purificar cápsides nativas en tubos de 38 mL. De igual manera que con las cápsides nativas, las fracciones se colectaron y se evaluaron por las mismas técnicas.

El proceso de purificación para cápsides nativas de VAA-8 se repitió, pero esta vez con las mismas proporciones de iodixanol empleadas para las cápsides modificadas.

Finalmente, las fracciones de interés de las cápsides nativas y modificadas se concentraron y se les intercambiaron el iodixanol por buffer PBS mediante centrifugación con tubos concentradores Corning® Spin-X® UF 6 mL de 50 kDa, a 4000 *g* y 4 °C hasta obtener el volumen deseado. Las muestras se almacenaron a -20 °C, y posteriormente, se analizaron por medio de Dot blot y MET. Para el Dot blot, se cargó 5 o 10 µg de proteína total diluido con PBS 1X en un volumen final de 100 µl.

La pureza de las cápsides se determinó mediante densitometría en los geles de SDS-PAGE usando el programa "Image Lab 6.0.1".

5.9.4. Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Las cápsides nativas y modificadas de VAA-8 de muestras clarificadas o purificadas se observaron mediante MET. Las muestras por evaluar se montaron en rejillas de

cobre 200 mesh fomvar/carbón (Electron Microscopy Sciences). Se colocaron 10 μL de la muestra en la rejilla durante 2 minutos, el excedente se retiró con papel absorbente libre de pelusas y se agregaron 10 μL de acetato de uranilo al 2% para la tinción negativa de las muestras. El acetato de uranilo se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos antes de usarse. Luego de 2 minutos de tinción, se retiró el excedente con papel absorbente, y las rejillas se colocaron en un portamuestras dejándolas secar al menos 30 minutos. Las rejillas se observaron en un microscopio electrónico Zeiss LIBRA 120 (Zeiss, Alemania), operado a 80 kV.

5.9.5. Criomicroscopía electrónica (crioME)

Las cápsides modificadas de VAA-8 se evaluaron a través de crioME en el “*New York Structural Biology Center*” (Nueva York, EUA). La metodología empleada se basa en la reportada por Zhao *et al.* (2019).

Las muestras se cargaron en rejillas de oro 300 mesh R1.2/1.3 UltrAuFoil®. A partir de una muestra a una concentración de 1.5 mg/mL, se tomaron 3 μL y se colocaron en la rejilla. Las rejillas se congelaron por inmersión en etano líquido (-180 °C) a través del congelador Leica EM GP (Leica Microsystems) después de un tiempo de transferencia de 1.5 s. Las rejillas se observaron en un microscopio electrónico Titan Krios (FEI) operado a 300 kV y equipado con una cámara de detección directa K2 (Gatan). Las imágenes se tomaron como un conjunto de 50 fotogramas cada una, durante un tiempo de exposición de 10 segundos y una dosis total de 68 e-/Å², a una magnificación de 22500X, lo cual corresponde a un tamaño de píxel final de 1.073 Å.

El mapa de densidad electrónica obtenido se analizó a través del programa UCSF Chimera versión 1.15 para Windows (CA, EUA). El mapa de la cápside modificada se alineó con la estructura 6UBM del PDB, la cual corresponde a la cápside nativa vacía de VAA-8 producida en el SCI-BV.

5.10. Producción de DenV-2 y de ZikV

En esta sección se describe la propagación, titulación e inactivación de DenV-2 y de ZikV empleados en el presente trabajo.

5.10.1. Propagación de DenV-2 y de ZikV

Se sembraron células C6/36 y se realizaron pases hasta alcanzar un volumen de 50 mL en frascos T225, como se menciona en 5.3. Posteriormente, se realizó la infección del cultivo con un stock de DenV-2 o ZikV. Para realizar la infección se descartó el medio de cultivo del frasco T225, la monocapa se lavó con PBS, luego se infectó con DenV-2 o ZikV en medio EMEM sin SFB en un volumen de 10 mL a una MDI de entre 0.01 a 0.03 unidades formadoras de focos (UFF)/célula. El frasco T225 se dejó incubando por 2 horas a 28 °C y 5% de CO₂, luego se agregaron 40 mL de medio EMEM, para obtener un volumen final de 50 mL y se dejó incubando por 60 a 72 horas a 28 °C y 5% de CO₂. Luego, los cultivos fueron cosechados para obtener DenV-2 y ZikV; para esto, las células se sometieron a tres ciclos de congelación y descongelación, y posteriormente, el cultivo se centrifugó a 2500 g por 15 minutos a 4 °C, el sobrenadante se filtró por 0.22 µm y se almacenó a -70 °C hasta su uso. Durante la propagación, se monitoreó el efecto citopático y el sobrenadante obtenido al final de la cosecha se evaluó por Dot blot con el AcM EDE1-C8. Para el Dot blot, como controles se emplearon 1 µg de la proteína E comercial de ZikV (proteína E monomérica) (Aalto Bioreagents, Cat. AZ6312) y 10 µL de sobrenadante cosechado de células C6/36 sin infectar; y de cada virus se cargó 10 µL de sobrenadante cosechado. Antes de cargarse en el los pozos, las muestras fueron diluidas en PBS 1X a un volumen final de 100 µL.

5.10.2. Titulación viral mediante la prueba de focos

El título viral de los stocks de DenV-2 y ZikV propagados se determinó mediante la prueba de focos en cultivo de células Vero E6. Se sembraron aproximadamente

0.07 x 10⁶ células viables Vero E6 por pozo en placas de 96 pozos en medio DMEM con 10% de SFB y se dejaron incubando por 24 horas a 37 °C y 8% de CO₂ en ambiente húmedo. Después de las 24 horas, se hicieron diluciones de 10⁻¹ a 10⁻⁵ de cada stock viral en medio DMEM sin SFB. Se retiró el medio de cultivo de las placas de 96 pozos y se añadieron 50 µl/pozo de cada dilución viral por duplicado. Al control negativo se le añadió solo medio DMEM sin SFB. La placa de 96 pozos se incubó por 2 horas a 37 °C y 8% de CO₂, luego del periodo de incubación se agregó 100 µl/pozo de medio DMEM con 10% de SFB y se incubó por 48 horas a 37 °C y 8% de CO₂ en ambiente húmedo. Luego del periodo de incubación, se retiró el medio, las células se fijaron con 50 µl/pozo de metanol frío durante 15 minutos, se retiró el metanol, las células se lavaron 3 veces con 300 µl de PBS/pozo, los pozos se bloquearon con 300 µl/pozo de gelatina 5 g/L y se incubaron a temperatura ambiente por 2 horas, se retiró la gelatina, se realizaron 2 lavados de los pozos con buffer PBS con Tween 20 al 0.1 % (PBST) y un lavado con PBS, se colocó 50 µl/pozo del AcM D1-11(3) contra DenV (Abcam, Cat. Ab9202) o un anticuerpo policlonal contra la proteína E de ZikV (GeneTex, Cat. 133314) diluidos 1:1000 en PBS con leche descremada al 1% y se incubó a temperatura ambiente por 1 hora, se descartó la solución de anticuerpo, se realizaron 2 lavados con PBST y un lavado con PBS, se colocó 50 µl/pozo de un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, Cat. 115-035-003) para el AcM contra DenV o de un anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, Cat. 2004) para el anticuerpo policlonal contra ZikV, ambos diluidos 1:2000 en PBS con leche descremada al 1% y se incubó a temperatura ambiente por 1 hora. Se descartó la solución de anticuerpo, se realizaron 2 lavados con PBST y un lavado con PBS, se agregó 50 µl/pozo de TMB (ThermoFisher Scientific) y se incubó a temperatura ambiente entre 30-40 minutos protegido de la luz, y finalmente se contaron los focos en el microscopio invertido de campo claro. Se contaron focos en la dilución mayor en la que se observaron focos. El título viral se determinó con la ecuación 6 y se reportó como UFF/mL.

Ecuación 6:

$$\frac{UFF}{mL} = \frac{\text{Promedio de N}^\circ \text{ de focos del duplicado (UFF)}}{\text{Volumen de inóculo de ZikV (mL)}} \times \text{dilución viral}$$

5.10.3. Inactivación de DenV-2 y ZikV mediante luz ultravioleta

Se colocaron 250 µl de DenV-2 o ZikV propagado y titulado por cada pozo de una placa de 6 pozos, y esta placa se irradió con luz ultravioleta (UV) durante 2 horas a temperatura ambiente. Para permitir que todas las partículas virales se expongan a la luz UV, cada 15 minutos se homogenizó el contenido de cada pozo. Posteriormente, los stocks virales inactivados se evaluaron por la prueba de focos.

5.11. Inmunización de ratones

5.11.1. Aprobación del proyecto por el comité de bioética

Se redactó un documento con una breve descripción del proyecto, justificación del uso de animales en el proyecto, diseño experimental, metodología, información sobre los animales requeridos, categoría del daño en los animales, uso de anestésico y flujo de trabajo para ser capacitado en la manipulación de ratones. Este documento fue aprobado por el Comité de Bioética del IBt-UNAM, y se le asignó el número de proyecto 370.

5.11.2. Inmunización de ratones BALB/c

Se emplearon ratones hembra de la cepa BALB/c. Estos se obtuvieron del Bioterio del IBt-UNAM, y todos los procedimientos con ellos, para evaluar la inmunogenicidad de las cápsidas modificadas de VAA-8, se llevaron a cabo en el área libre de patógenos de este Bioterio; mientras que la inmunización para obtener

sueros control positivo se realizó en la “Sala de Patógenos” del IBt-UNAM. Los ratones fueron tatuados en las colas a través del sistema automatizado Labstamp® (Somark, EUA).

Para la evaluación de la respuesta inducida por las cápsides modificadas de VAA-8, se evaluaron dos diseños experimentales de vacunación, pero antes se obtuvo el suero preinmune de todos los individuos. En el primer diseño experimental se inmunizaron ratones de entre 10 a 11 semanas de edad, y en el segundo diseño experimental, de entre 13 y 14 semanas de edad. En ambos diseños, los antígenos fueron administrados con una jeringa de insulina y en volúmenes finales de 50 µL. La vía de administración para el primer diseño fue la subcutánea, y para el segundo diseño, la intramuscular.

Ambos diseños experimentales estuvieron formados por cuatro grupos, y cada grupo estuvo formado por cinco individuos. En el primer diseño experimental, se usaron cápsides modificadas de VAA-8 purificadas con las proporciones de la variante “Nueva 2” (descrito en 5.9.3) y cápsides nativas de VAA-8 contenidas en el clarificado de células Sf9 infectadas con bacRep Cap 2/8; mientras que, en el segundo diseño experimental, ambas cápsides empleadas fueron purificadas con las proporciones de la variante “Nueva 2”.

Con respecto al primer diseño experimental, el primer grupo fue inmunizado con 20 µg de proteína total que contenía a las cápsides modificadas; el segundo grupo, con 10 µg de proteína total que contenía a las cápsides modificadas más adyuvante incompleto de Freund (AIF); el tercer grupo, con 20 µg de proteína total que contenía a las cápsides nativas; y el cuarto grupo, con solo PBS. Todos los grupos recibieron cuatro dosis. La segunda dosis o primer refuerzo se aplicó a los 15 días post inmunización (dpi), y las cantidades administradas fueron las mismas que se aplicaron en la primera dosis. La tercera dosis o segundo refuerzo se aplicó a los 39 dpi, el primer grupo recibió 8 µg de proteína total que contenía a las cápsides modificadas más el adyuvante Imject Alum® (alúmina) (suspensión de hidróxido de aluminio e hidróxido de magnesio) (Thermo Scientific™, Cat. 77161); el segundo grupo, 8 µg de proteína total que contenía a las cápsides modificadas más AIF; el tercer grupo, 10 µg de proteína total que contenía a las cápsides nativas; y el cuarto

grupo, solo PBS. La cuarta dosis o tercer refuerzo se aplicó a los 53 dpi, el primer y el segundo grupo recibieron 20 µg de proteína total que contenía a las cápsides modificadas; el tercer grupo, 20 µg de proteína total que contenía a las cápsides nativas; y el cuarto grupo, solo PBS. En los grupos que recibieron adyuvante, este se usó en igual volumen al que contenía al antígeno, es decir, si cada ratón recibió 50 µL de volumen final, 25 µL fueron de adyuvante.

Con respecto al segundo diseño experimental, el primer grupo fue inmunizado con 100 µg de proteína total que contenía a las cápsides modificadas más AIF; el segundo grupo, con 100 µg de proteína total que contenía a las cápsides nativas más adyuvante AIF; el tercer grupo, con 5 µg de PPV de ZikV formadas por las proteínas E y prM, las cuales fueron donadas por Jocelyn Uribe; y el cuarto grupo, con solo PBS. Al igual que en el primer diseño experimental, todos los grupos recibieron cuatro dosis. La segunda, la tercera y la cuarta dosis se aplicaron a los 15, 30 y 45 dpi, respectivamente, y las cantidades administradas fueron las mismas, pero en la cuarta dosis no se administró AIF. En este diseño, el AIF también se administró en igual proporción de volumen.

Los sueros inmunes se colectaron a los 65 dpi para el primer diseño experimental, y, a los 23 y 116 dpi para el segundo diseño experimental. Para la obtención de sueros, los ratones fueron inmovilizados mediante un cepo, con una hoja de bisturí se les realizó un corte transversal de 1 mm aproximadamente en el extremo distal de la cola y se les frotó la cola para estimular el goteo de sangre dentro de microtubos de 1.5 mL hasta colectar entre 100-300 µL de sangre. La sangre colectada fue centrifugada a 12 000 rpm durante 2 minutos a 4 °C y se colectó entre 10-60 µL de suero que fue almacenado a -70 °C para ser evaluados posteriormente a través de la prueba de ELISA.

Los diseños experimentales de inmunización se muestran en las tablas 5 y 6, y las líneas de tiempo, en las figuras 17 y 18.

Tabla 5. Primer diseño experimental de inmunización de ratones BALB/c.

Grupo	Inmunógeno	Inmunización	Dosis (μg de proteína total/ratón)		
			1° refuerzo	2° refuerzo	3° refuerzo
1	Cap Mod	20	20	8 + AL	20
2	Cap Mod	10 + AIF	10 + AIF	8 + AIF	20
3	Cap Nat	20	20	10	20
4	PBS	-	-	-	-

Cap Mod: cápsides modificadas de VAA-8. Cap Nat: cápsides nativas de VAA-8. PBS: solo PBS. AIF: adyuvante incompleto de Freund. AL: adyuvante alúmina.

Tabla 6. Segundo diseño experimental de inmunización de ratones BALB/c.

Grupo	Inmunógeno	Inmunización	Dosis (μg de proteína total/ratón)		
			1° refuerzo	2° refuerzo	3° refuerzo
1	Cap Mod	100 + AIF	100 + AIF	100 + AIF	100
2	Cap Nat	100 + AIF	100 + AIF	100 + AIF	100
3	PPV ZikV	5	5	5	5
4	PBS	-	-	-	-

Cap Mod: cápsides modificadas de VAA-8. Cap Nat: cápsides nativas de VAA-8. PPV ZikV: partículas pseudovirales de ZikV. PBS: solo PBS. AIF: adyuvante incompleto de Freund.

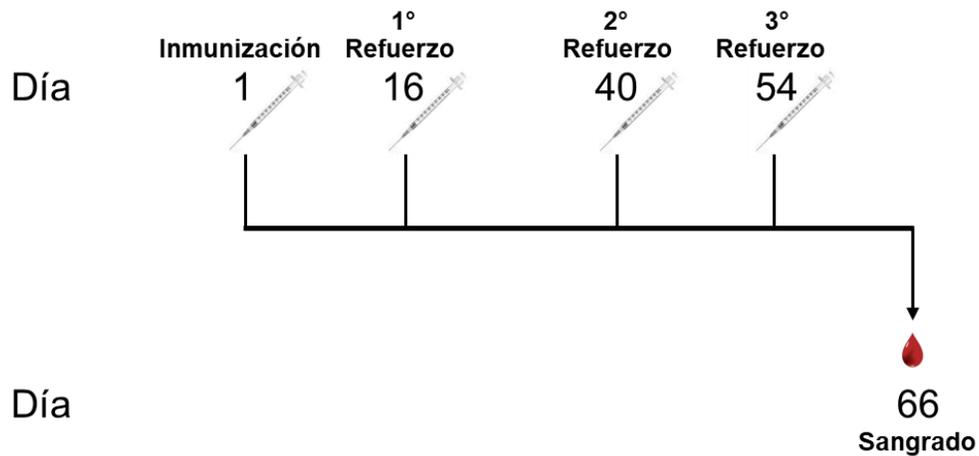


Figura 17. Línea de tiempo de la inmunización, refuerzos y sangrado para la colecta de suero del primer diseño experimental.

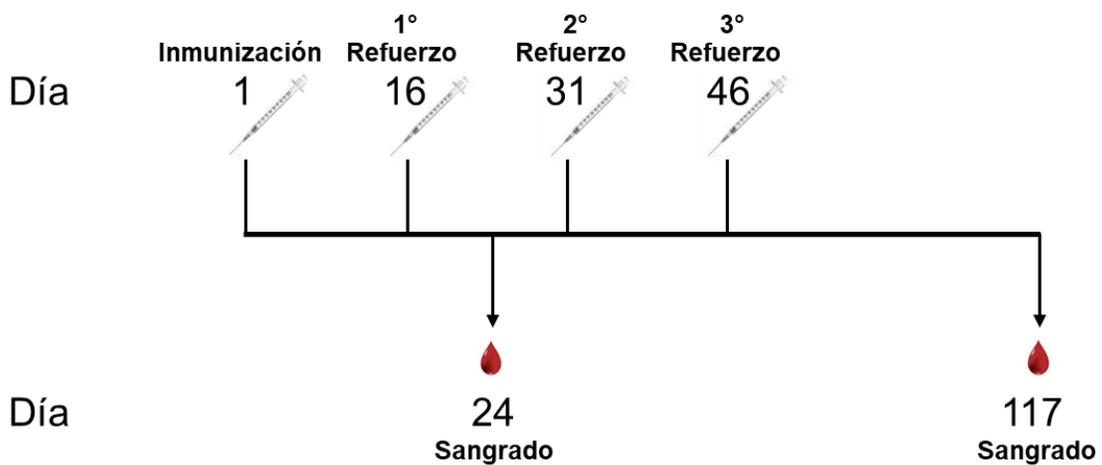


Figura 18. Línea de tiempo de la inmunización, refuerzos y sangrados para la colecta de suero del segundo diseño experimental.

Por otro lado, para obtener sueros control positivo, dos ratones de 8 semanas de edad se inmunizaron vía intramuscular con 50 μ L de DenV-2 o ZikV propagado en células C6/36 con título de 10^4 UFF/mL e inactivado (descrito en 5.10). Los sueros de estos ratones se colectaron a los 14 dpi a través de la metodología descrita líneas arriba.

5.12. Evaluación de la respuesta inmune humoral

5.12.1. Método de ELISA indirecto

Se realizó la prueba de ELISA indirecto para detectar anticuerpos IgG anti-DenV-2 y anti-ZikV en sueros preinmunes y sueros colectados después de la inmunización.

Se sensibilizaron placas Costar “high-binding” de 96 pozos (Corning®) cubriendo con 50 µL/pozo de DenV-2 o ZikV propagado en células C6/36 con título de 10⁴ UFF/mL e inactivado, o con 50 µL/pozo de PBST (Tween 20 al 0.1%), e incubando toda la noche a 4 °C. Los pozos de las muestras, sueros controles y blanco se cubrieron con DenV-2 o ZikV, y el control de bloqueo se cubrió solo con PBST. Los pozos se lavaron tres veces con 300 µL/pozo de PBST y se bloquearon con 300 µL/pozo de gelatina a una concentración de 5 g/L en PBST durante 2 h a 37 °C. Los pozos se lavaron tres veces con 300 µL/pozo de PBST, se añadieron 50 µL/pozo de los sueros problema y sueros controles diluidos en PBST, en los pozos correspondientes, según el diseño de la placa de trabajo, y al blanco y al control de bloqueo se les añadieron 50 µL/pozo de PBST; y la placa se incubó 1 h a 37 °C.

Como sueros control positivo, se emplearon sueros de ratones inmunizados con DenV-2 o ZikV inactivado diluidos 1:100. Los pozos se lavaron tres veces con 300 µL/pozo de PBST, se colocaron 50 µL/pozo del anticuerpo secundario diluido 1:1000 en PBST a todos los pozos, y se incubó 1 h a 37 °C. Como anticuerpo secundario se empleó el anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, Cat. 115-035-003). Los pozos se lavaron tres veces con 300 µL/pozo de PBST, se reveló colocando 50 µL/pozo del sustrato TMB (Invitrogen, Cat. 002023), y la placa se incubó durante 5 a 12 minutos protegida de la luz. Luego, la reacción se detuvo colocando 50 µL/pozo de HCl al 0.5 N.

Para determinar el título de anticuerpos IgG anti-DenV-2 y anti-ZikV en los sueros problema, se evaluaron diluciones seriadas 1:2 de estos sueros, iniciando en la dilución 1:100 hasta la dilución 1:12800. Cada dilución se analizó por duplicado. Luego de detener la reacción con el sustrato, la absorbancia de cada pozo se leyó a 450 nm en el lector de microplacas FLUOstar Omega.

En la figura 19 se observa el diseño de la evaluación en la placa de 96 pozos para la determinación de los títulos de anticuerpos.

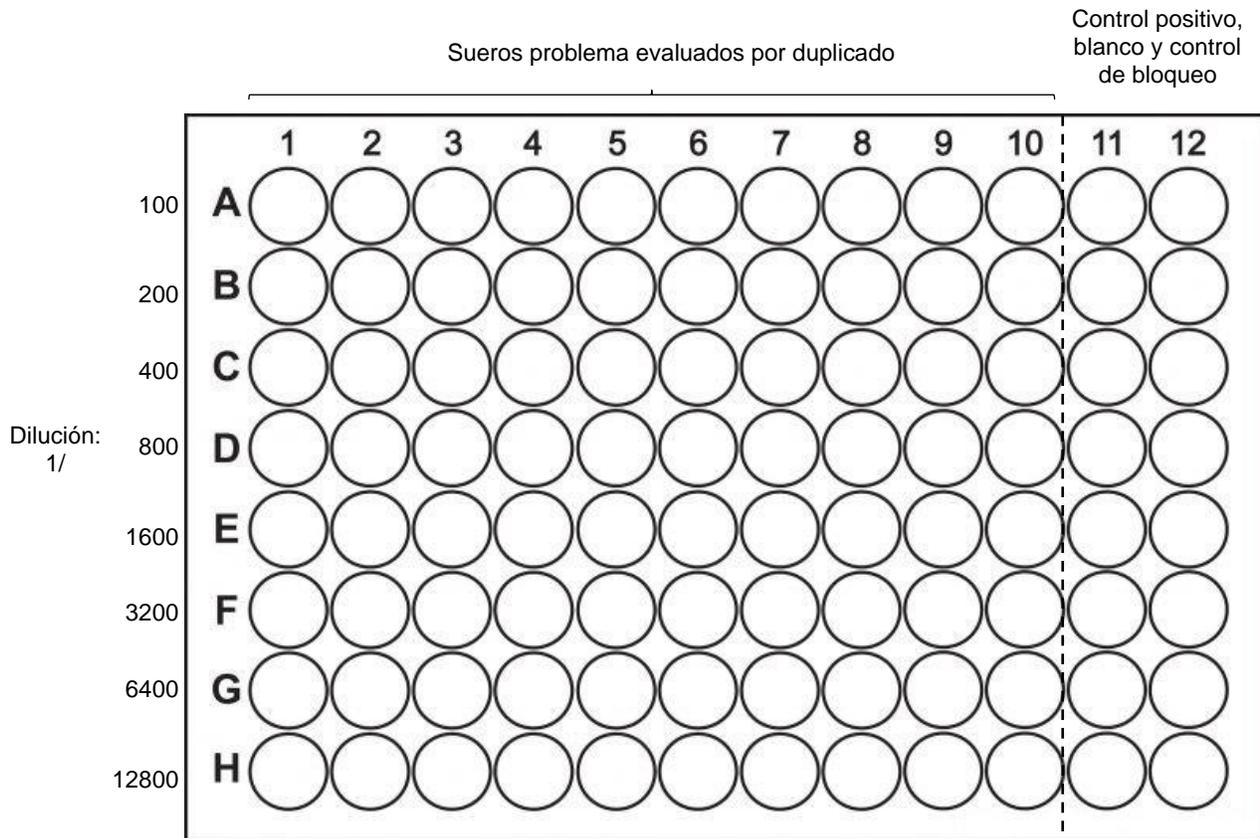


Figura 19. Diseño de trabajo en la placa de 96 pozos para la determinación de los títulos de anticuerpo IgG anti-virus dengue del serotipo 2 o anti-virus Zika.

5.12.2. Procesamiento de datos y determinación del título de anticuerpos IgG

Los valores de absorbancia (OD) a 450 nm de los duplicados de cada dilución de cada suero problema se promediaron. Los datos son presentados como la media aritmética (promedio) y la desviación estándar (DE).

Para calcular el título de anticuerpos de cada individuo se empleó el método a punto final (“*endpoint titer*”) (Frey *et al.*, 1998); para esto, el título fue el recíproco de la máxima dilución del suero que presenta un valor de absorbancia a 450 nm mayor al doble de la absorbancia del promedio de los blancos. Los títulos de anticuerpos de

cada grupo experimental son presentados como la media geométrica y el intervalo de confianza del 95% para la media geométrica (IC 95%).

Se evaluó si los títulos de anticuerpos de cada grupo siguen una distribución normal mediante la prueba de Kolmogórov-Smirnov. Las comparaciones de títulos de anticuerpo entre dos grupos independientes se realizaron mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Estos análisis se realizaron con el paquete estadístico GraphPad Prism versión 6.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Las diferencias entre grupos se consideraron estadísticamente significativas cuando los valores p (p-valor) fueron menores a 0.05 y se indican con un *.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Construcción del plásmido pSR660M1

Como se describe en 5.4, para la construcción del vector pSR660M1 primero se clonó el fragmento 301 gBlock en el vector pJET1.2/blunt. En la figura 20 se muestra el patrón de restricción con PvuI de tres colonias candidatas a tener la clonación del fragmento 301 gBlock.

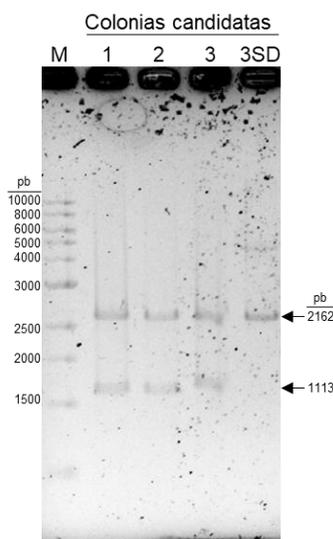


Figura 20. Patrón de restricción de pJET1.2/blunt más inserto 301 gBlock con la enzima PvuI. Analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. M: marcador de 1kb. 1,2 y 3: plásmidos digeridos de las colonias candidatas 1, 2 y 3. 3SD: plásmido sin digerir de la colonia 3. Las flechas indican bandas de 2162 y 1113 pb.

El vector pJET1.2/blunt tiene una longitud de 2974 pb, y un sitio de corte único para la enzima PvuI; mientras que el vector pJET1.2/blunt con la inserción del fragmento 301 gBlock tiene una longitud de 3275 pb y dos sitios de corte para la enzima PvuI, y uno de ellos se encuentra dentro del fragmento 301 gBlock. En la figura 20 se observan las bandas esperadas de 2162 pb y 1113 pb en los carriles de los plásmidos digeridos de las colonias 1, 2 y 3. Este patrón confirma la clonación del fragmento 301 gBlock en el vector pJET1.2/blunt.

En el quinto carril de la figura 20, se observan bandas que corresponde al plásmido de la colonia 3 sin digerir con PvuI (3 SD); la banda entre los 2 kb y 3 kb del marcador podría deberse a un estado conformacional superenrollado del vector. El vector

pJET1.2/blunt sin inserto es un plásmido lineal, por lo tanto, al evaluarse en una corrida electroforética, se esperaría una sola banda de 2974 pb.

La clonación del fragmento 301 gBlock en el vector pJET1.2/blunt se realizó para mantener el fragmento 301 gBlock dentro de un vector y poder utilizar a este vector como molde para amplificar fácilmente el fragmento 301 gBlock, que fue empleado para la construcción de pSR660M1.

Después de la verificación de la inserción del fragmento 301 gBlock, se procedió a la construcción del vector pSR660M1. El resultado de la evaluación de seis colonias candidatas a tener al plásmido pSR660M1, mediante patrón de restricción con la enzima PvuI, se muestra en la figura 21.

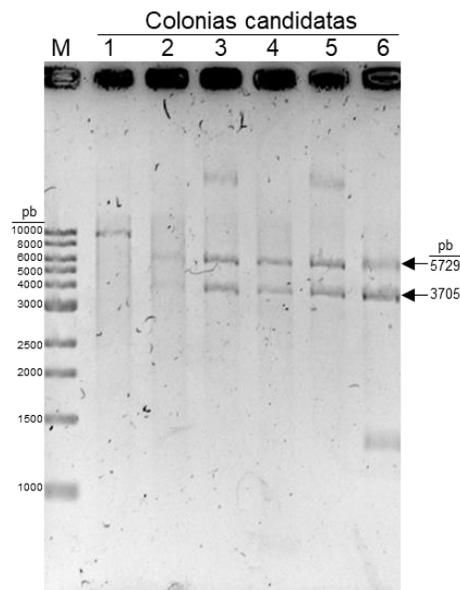


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del producto de la digestión de los plásmidos purificados de seis colonias candidatas a presentar la construcción pSR660M1, con la enzima de restricción PvuI. M: marcador de 1kb. 1, 2, 3, 4, 5 y 6: plásmidos digeridos de las colonias candidatas 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Las flechas indican bandas de 5729 y 3705 pb.

El vector pSR660 tiene una longitud de 9362 pb, y un sitio de corte único para la enzima PvuI (Anexo 1, Figura A1); mientras que la longitud esperada del vector pSR660M1 es de 9434 pb y presentaría dos sitios de corte para la enzima PvuI, y uno de ellos se situaría dentro del inserto de 72 pb (Figura 22).

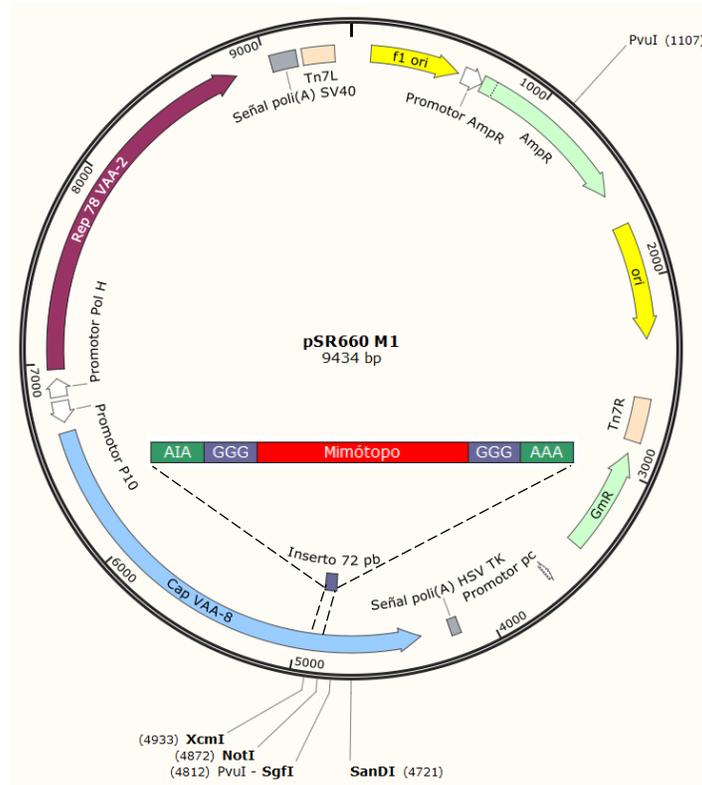


Figura 22. Plásmido pSR660M1. Contiene la inserción de 72 pb, que incluye a la secuencia del mimótopo del epítipo EDE1, dentro del gen *cap* del VAA-8. Visualizado con SnapGene™ 1.1.3.

En la figura 21, los carriles de las colonias 2, 3, 4, 5 y 6 presentan las bandas esperadas de 5729 pb y 3705 pb para la construcción pSR660M1 digerida con la enzima PvuI, el carril de la colonia 1 solo presenta una banda correspondiente al tamaño del vector pSR660 lineal (9362 pb), los carriles de las colonias 3 y 4 presentan una banda de más de 10 kb, esta banda podría pertenecer al vector sin digerir o a DNA cromosómico que se extrajo por error cuando se purificaron los plásmidos. El carril de la colonia 6 presenta una banda por debajo de 1 kb, no se sabe el porqué de esta banda.

Los plásmidos de las colonias 3 y 4 se mandaron a secuenciar, el resultado fue la presencia del inserto de 72 pb en el plásmido de la colonia 3 y la presencia de este por duplicado en la colonia 4.

Se volvió a extraer plásmido de la colonia 3 y a digerir con la enzima PvuI, y esta vez no se observó la banda de un tamaño mayor a 10 kb que aparece en la figura 20; probablemente, en la extracción anterior se obtuvo DNA cromosómico por un mal procedimiento con el kit “Zippy™ Plasmid Miniprep Kit”, u ocurrió algún error en el procedimiento de digestión (por ejemplo, no haber colocado la cantidad suficiente de enzima de restricción). La digestión de esta segunda extracción se muestra en la figura 23.

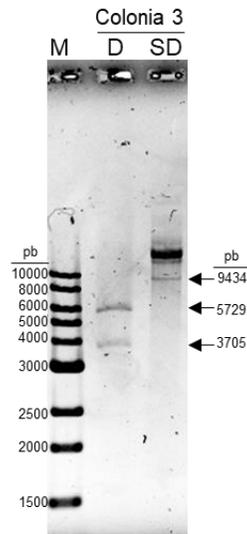


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de la digestión del plásmido pSR660M1 extraído por segunda vez de la colonia 3, con la enzima de restricción PvuI. M: marcador de 1kb. D: plásmido digerido de la colonia 3. SD: plásmido sin digerir de la colonia 3. Las flechas indican bandas de 9434, 5729 y 3705 pb.

En la figura 23 se observa la presencia de las 2 bandas esperadas. Con la verificación del inserto de 72 pb dentro del plásmido de la colonia 3, y la verificación de que solo está presente una vez y no por duplicado como en el plásmido de la colonia 4, se logró cumplir el objetivo uno, que es construir un plásmido que contenga la inserción de la secuencia del mimótopo dentro de la secuencia del gen *cap* de VAA-8 (Figura 22).

La posición elegida para la inserción de los sitios de restricción, las glicinas y el mimótopo se debe a que esta posición es similar a la posición en la que ya se han desplegado péptidos inmunogénicos en la cápside de VAA-2 (Nieto *et al.*, 2012). Además, la inserción de otros péptidos entre los codones 590 y 591 de VAA-8 ya

ha sido ampliamente explorada con éxito para modificar o mejorar del tropismo de VAA-8 (Büning y Srivastava, 2019).

De manera más específica, la localización de la inserción de los 72 pb dentro del gen *cap* y de las secuencias de las proteínas VPs se muestran en la figura 24.

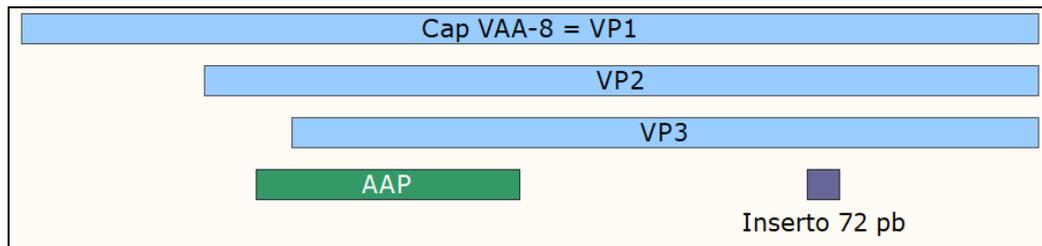


Figura 24. Visualización de la posición de la inserción de los 72 pb dentro del marco de lectura del gen *cap* de virus adeno-asociado del serotipo 8.

La inserción ocurrió en la secuencia del gen *cap* codificante para la región del carboxilo terminal, por lo tanto, esta inserción estará presente en las tres proteínas estructurales de VAA-8, tal como se ilustra en la figura 24. Además, esta inserción no se encuentra dentro de la secuencia codificante para la proteína AAP (Figura 24), por ello, la función de ésta no se ve afectada.

Como en las plataformas generadas por Nieto *et al.* (2012) y Singer *et al.* (2016) para el despliegue de péptidos inmunogénicos en VAA-2, el vector pSR660M1 posee los sitios de restricción de las enzimas NotI y SgfI insertados entre los codones 590 y 591 del gen *cap* de VAA-8, los cuales se pueden emplear en otros experimentos o proyectos para insertar secuencias de otros mimótopos o péptidos inmunogénicos que deseen desplegarse en la cápside VAA-8.

Los reportes de despliegue de péptidos vacunales en VAA-2 (Singer *et al.*, 2016; Jagu *et al.*, 2015; Manzano-Szalai *et al.*, 2014; Nieto *et al.*, 2012) solo incluyen a la secuencia de la proteína VP3, y requieren de la coexpresión de la proteína AAP para obtener PPV, esto debido a que AAP es esencial para el ensamblaje de PPV de VAA-2 y a que la secuencia de solo VP3 no incluye a toda la secuencia de AAP (Figura 24); mientras que la plataforma para VAA-8 generada aquí, incluye a todo el gen *cap*, y por eso, se obtendrían PPV conformadas por las 3 VPs y sin necesidad

de coexpresar la proteína AAP (Figura 24). Por lo tanto, al cumplir el objetivo uno del proyecto, se generó una plataforma para la inserción de péptidos, que pueden ser vacunales, dentro de las tres proteínas estructurales o cápside de VAA-8.

6.2. Construcción del baculovirus recombinante bacCapMod

6.2.1. Generación del báculo recombinante

El vector pSR660M1 ya presenta la secuencia del mimótopo, por lo cual, se empleó como vector donador para la generación del báculo recombinante y del baculovirus recombinante como se describe en el proceso del sistema Bac-to-Bac en 2.6.

Las electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los productos de PCR para verificación de la obtención del báculo recombinante de interés se muestran en la figura 25.

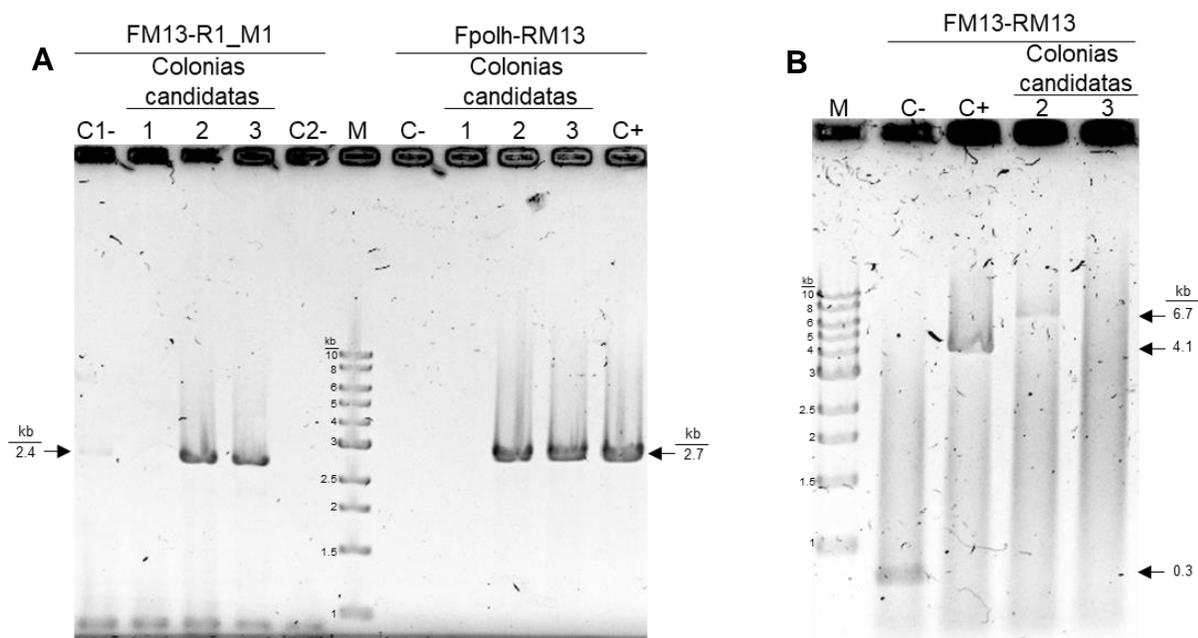


Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los productos de PCR para verificar la presencia de la generación del báculo recombinante. (A) Productos PCR generados con los oligonucleótidos FM13-R1_M1 y FPolh-RM13. Las flechas indican bandas de 2.4 y 2.7 kb. (B) Productos de PCR generados con los oligonucleótidos FM13-RM13. M: marcador de 1kb. Las PCR

usaron como moldes a control negativo 1 (C1-): b́acmido de una colonia azul, control negativo 2 (C2-): b́acmido recombinante donado por Jocelyn Uribe, control negativo (C-) = C1-, control positivo (C+) = C2-, y, 1, 2 y 3: b́acmidos de colonias blancas candidatas a ser los b́acmidos recombinantes de inteŕes. Las flechas indican bandas de 6.7, 4.1 y 0.3 kb.

El oligonucléotido FM13 hibrida sobre una regi3n que flanquea al sitio de recombinaci3n Tn7R del b́acmido, mientras que el oligonucléotido R1-M1 hibrida en el inserto de 72 pb, es decir este ́ltimo oligonucléotido es espećfico para el inserto de 72 pb que contiene la secuencia del mim3topo. En la figura 25A, empleando a los oligonucléotidos FM13-R1_M1, se observa la presencia de la banda esperada de aproximadamente 2.4 kb en los carriles de las colonias candidatas blancas 2 y 3. El control negativo 1 (C1-) corresponde al producto de PCR que emple3 b́acmido de una colonia aparentemente azul; sin embargo, se observa una banda tenue alrededor de los 2.4 kb, lo cual se puede deber a que este control negativo corresponde a una colonia azul que probablemente estaba mezclada con una colonia blanca. El control negativo 2 (C2-) corresponde al producto de PCR que emple3 un b́acmido recombinante que no contiene el inserto de inteŕes, y, por lo tanto, el oligonucléotido R1_M1, que hibrida espećficamente en el inserto de inteŕes, no permite la amplificaci3n de alg3n fragmento correspondiente al inserto dentro del b́acmido recombinante del C2-.

El oligonucléotido FPolh hibrida sobre el promotor de poliedrina (Pol_H), que se encuentra dentro del b́acmido recombinante de inteŕes y tambi3n dentro del b́acmido recombinante que fue donado por Jocelyn Uribe, el cual presenta un gen insertado de aproximadamente 1.8 kb bajo este promotor. El oligonucléotido RM13 hibrida sobre una regi3n que flanquea al sitio de recombinaci3n Tn7L del b́acmido. En la figura 25A, en la evaluaci3n con los oligonucléotidos FPolh-RM13 se observa la presencia de la banda esperada de aproximadamente 2.7 kb en los carriles de las colonias 2 y 3. El control negativo (C-) es el que se denomin3 C1- en la evaluaci3n con los oligonucléotidos FM13-R1_R1, y a diferencia a la banda que se observ3 en la evaluaci3n con los oligonucléotidos FM13-R1_M1, en esta evaluaci3n no se observ3 alguna banda. El control positivo (C+) es el que se denomin3 C2- en la evaluaci3n con los oligonucléotidos FM13-R1_M1. Este b́acmido recombinante presenta una banda de peso cercano a los 2.7 kb, tal como se esperaba.

Como se mencionó, los oligonucleótidos FM13 y RM13 hibridan sobre las regiones que flanquean a los sitios de recombinación Tn7R y Tn7L del miniTn7 presente en el b́acmido, respectivamente. Cuando se genera un b́acmido recombinante con el vector pFastBacTM1 y se ejecuta una PCR con los oligonucleótidos FM13-RM13, el amplicón esperado es de 2300 pb más el tamaño del inserto, y para el pFastBacTMDual, es de 2560 pb más el tamaño del inserto (Manual del sistema Bacto-Bac®). Por otro lado, los oligonucleótidos FM13-RM13 hibridan sobre el b́acmido y amplifican un fragmento aproximado de 300 pb cuando no hay inserto recombinado. En la figura 25B, el control negativo (C-) es el mismo que se empleó en la evaluación con los oligonucleótidos FPolh-RM13, por lo tanto, al realizarse una PCR con los oligonucleótidos FM13-RM13 y empleando b́acmido de una colonia azul (no recombinante) como molde, el tamaño esperado del amplicón será de 300 pb (0.3 kb), tal como se observa en el carril 2 del gel de agarosa en la figura 25B. El control positivo (C+) es el mismo que se empleó en la evaluación con los oligonucleótidos FPolh-RM13, y es un b́acmido recombinante que se generó con un vector pFastBac 1 que tiene insertado un gen de 1.8 kb, por lo tanto, el tamaño del amplicón esperado, al realizar una PCR empleando los oligonucleótidos FM13-RM13 y este b́acmido recombinante como templado, es de 4.1 kb, tal como se observa en el carril 3 de la figura 25B. El b́acmido recombinante de interés fue generado con el vector pFastBac Dual que tiene un inserto de 4155 pb (pSR660M1), 1866 pb corresponden al gen *rep* del VAA-2, 2217 pb corresponden al gen *cap* del VAA-8, y 72 pb corresponden al inserto que incluye la secuencia del mimótopo y otros elementos que se describieron previamente. Por lo tanto, el tamaño del amplicón esperado al realizar una PCR empleando los oligonucleótidos FM13-RM13 y este b́acmido recombinante como templado, es de 6.7 kb, tal como se observa en el carril 4 de la figura 25B.

La PCR con los oligonucleótidos FM13-RM13 permitió verificar la presencia del inserto de interés en el b́acmido recombinante de la colonia 2, mientras que las otras dos PCR permitieron verificar que la recombinación ocurrió en el sentido correcto para que el gen *cap* con la secuencia del mimótopo puedan expresarse en el SCI-BV.

6.2.2. Transfección de células Sf9

La transfección de células Sf9 se realizó empleando el báculo recombinante de la colonia blanca 2, que fue evaluada y seleccionada por los resultados de PCR descritos en 6.2.1. Los resultados de transfección se muestran en la figura 26.

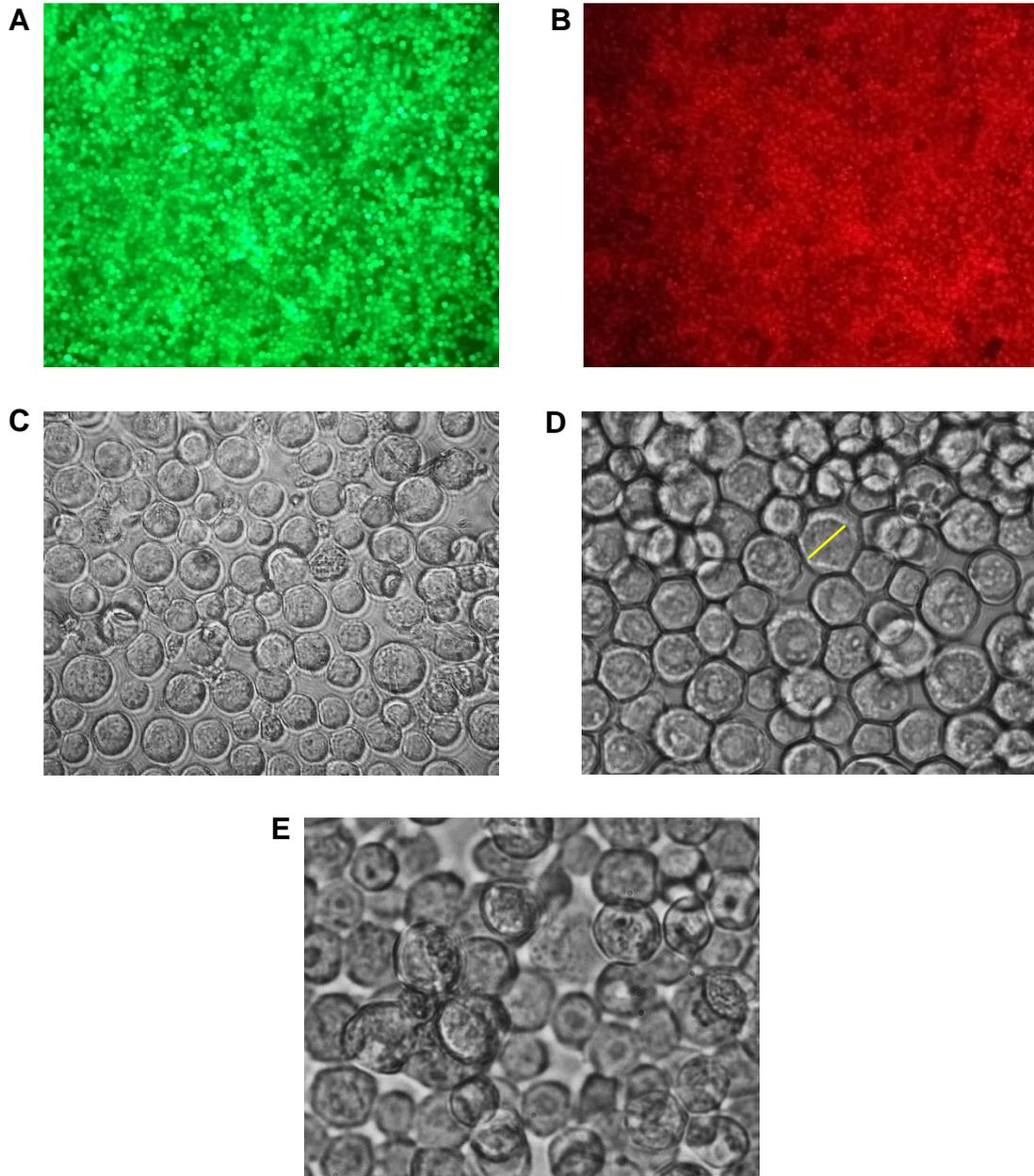


Figura 26. Células Sf9 transfectadas con báculos recombinantes. (A) Células Sf9 transfectadas con el báculo que codifica para eGFP y RFP, a 100X y visualizada en el canal verde de fluorescencia a los 9 días post transfección. (B) Células Sf9 transfectadas con báculo que codifica para eGFP y RFP, a 100X y visualizada en el canal rojo de fluorescencia a los 9 días post transfección. (C) Células Sf9 sin transfectar a 600X y a los 4 días de cultivo. (D) Células Sf9

transfectadas con 1 µg de b crido que codifica para las VPs modificadas de VAA-8, a 600X y a los 4 días post transfección. La línea amarilla señala el diámetro del núcleo. (D) Células Sf9 transfectadas con 2 µg de b crido que codifica para las VPs modificadas de VAA-8, a 600X y a los 4 días post transfección.

Como control del proceso de transfección se empleó un b crido recombinante que codifica para las proteínas fluorescentes eGFP y RFP. En la figura 26 se muestran las células Sf9 transfectadas con el b crido recombinante control, y con el generado por recombinación con el vector pSR660M1.

La fluorescencia observada en los controles (Figuras 26A y 26B) indican que el proceso de transfección fue exitoso. Cuando las células Sf9 se transfectan con un b crido, se producen baculovirus, ya que este vector contiene todos los elementos necesarios para su producción. Durante la infección viral, estos baculovirus generan efectos citopáticos en las células de insecto, y entre estos se pueden observar hinchamiento del núcleo celular, aumento del tamaño en las células y gránulos (Williams y Faulkner, 1997; Palomares *et al.*, 2001; O'Reilly *et al.*, 1994).

En las figuras 26D y 26E, se muestran células de mayor diámetro en comparación a las células de la figura 26C, esto se debe al efecto citopático causado por los baculovirus producidos por la transfección. En la figura 26D se puede observar el gran tamaño de los núcleos celulares debido al efecto citopático en las células Sf9 transfectadas con 1 µg del b crido recombinante que contiene el inserto de interés. El núcleo abarca casi el total del tamaño de la célula, señalado con una línea amarilla en una de las células que aparece en el centro de la figura 26D. En la figura 26E no se observa un gran tamaño de los núcleos, no se observa confluencia como en las figuras 26C y 26D, y se muestran células que no est n adheridas a la base del soporte de cultivo celular, esto se deber a a un error experimental durante la transfección con 2 µg del b crido recombinante. Los baculovirus son virus l ticos, y por ello se puede obtener al baculovirus recombinante bacCapMod, directamente de los sobrenadantes de las células transfectadas.

Para la evaluación de la producción de baculovirus, se empleó el AcM AcV5 para detectar la presencia de la proteína GP64, la cual es la principal proteína de superficie del baculovirus (Monsma *et al.*, 1996); y, para detectar a las proteínas

VPs modificadas de VAA-8, se usó el AcM B1. En la figura 27 se muestra el resultado del Western blot para detección de baculovirus y proteínas VPs de VAA.

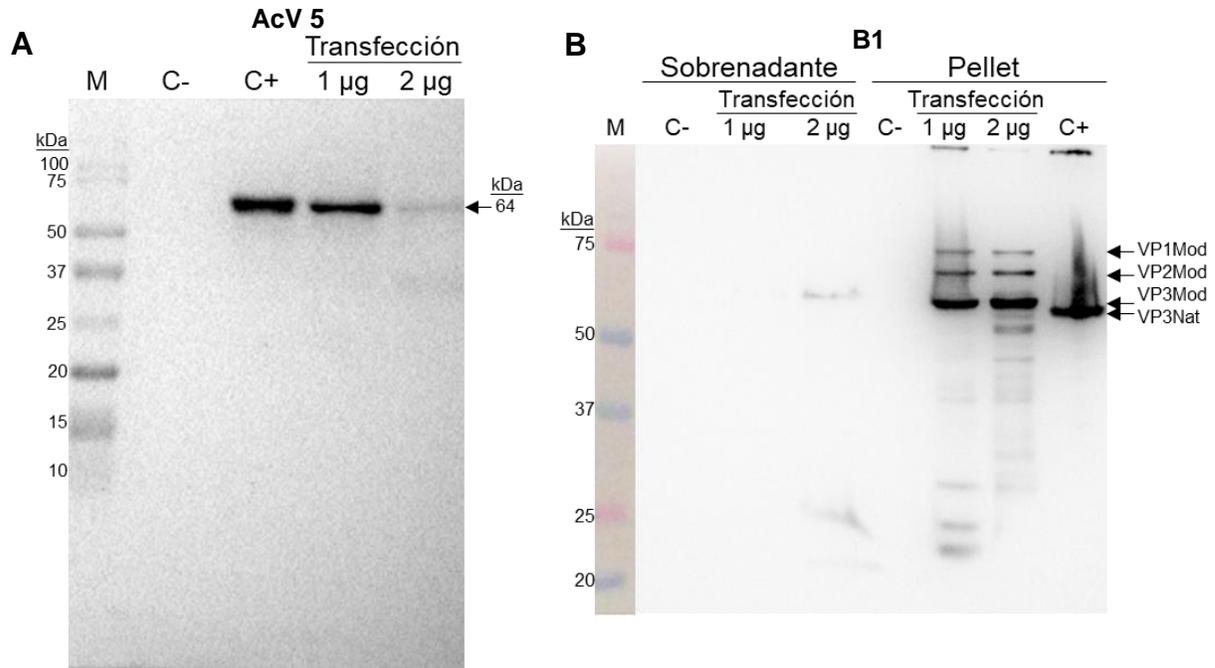


Figura 27. Western blot para la evaluación de la producción de baculovirus y la expresión de las proteínas VP1, VP2 y VP3 modificadas de virus adeno-asociado del serotipo 8. (A) Western blot del sobrenadante de la transfección para detectar GP64 con el AcM AcV5. M: marcador dual color. Control negativo (C-): sobrenadante de cultivo de células Sf9 sin transfectar, control positivo (C+): bacRep Cap 2/8, 1 µg y 2 µg: sobrenadante de cultivo de células Sf9 transfectadas con 1 µg y 2 µg de báculo recombinante, respectivamente. La flecha indica la banda de 64 kDa de GP64. (B) Western blot del sobrenadante y del pellet de la transfección para detectar las proteínas VPs modificadas de VAA-8 con el AcM B1. M: marcador dual color. Para el sobrenadante, control negativo (C-): sobrenadante de cultivo de células Sf9 sin transfectar, y, 1 µg y 2 µg: sobrenadante de cultivo de células Sf9 transfectadas con 1 µg y 2 µg de báculo recombinante, respectivamente. Para el pellet, control negativo (C-): pellet de cultivo de células Sf9 sin transfectar, y, 1 µg y 2 µg: pellet de cultivo de células Sf9 transfectadas con 1 µg y 2 µg de báculo recombinante, respectivamente, y, control positivo (C+): VP3 de VAA-2 extraído de pellet de cultivo de células Sf9. Las flechas indican las bandas de VP1, VP2 y VP3 modificadas (VP1Mod, VP2Mod y VP3Mod, respectivamente), y la banda de VP3 nativa (VP3Nat).

En la figura 27A, se observa la banda de 64 kDa correspondiente a la proteína GP64 del baculovirus en los carriles del control positivo y los carriles correspondientes a las transfecciones con el báculo recombinante. El carril de la transfección con 1 µg exhibe una banda más intensa de 64 kDa en comparación al carril de la transfección con 2 µg; sin embargo, el carril correspondiente a los 2 µg presenta una banda pronunciada entre los pesos de 25 y 37 kDa. Bandas de menos peso

molecular detectadas con un anticuerpo anti-GP64, se han observado como productos de proteólisis en reportes como los de Hom y Volkman (1998).

Por otra parte, el AcM B1 reconoce las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3 de VAA-2 y de VAA-8 al unirse al epítipo común "IGTRYLTR" en la región C-terminal de estas tres proteínas entre los residuos de aa 729 y 736 (posiciones referentes a VP1 de VAA-8, número de acceso: NC_006261.1) (Mietzsch *et al.*, 2014; Wobus *et al.*, 2000). Al usar este AcM se observan las bandas correspondientes a las proteínas VP1, VP2 y VP3 modificadas (VP1Mod, VP2Mod y VP3Mod, respectivamente) de VAA-8 en los carriles de las muestras de pellet celular resuspendido de las transfecciones con 1 µg y 2 µg de bácmido recombinante (Figura 27B). Por otro lado, no se observa presencia significativa de VPs en el sobrenadante de las transfecciones debido a que al igual que las VPs nativas recombinantes de VAA-8, estas se localizan principalmente dentro de las células Sf9 y no en el medio extracelular (Gallo-Ramírez *et al.*, 2011). El reconocimiento de las VPs modificadas por el AcM B1 no se afecta, ya que la inserción se dio en las posiciones 590 y 591 de VAA-8, posiciones lejanas al epítipo que reconoce AcM B1, las cuales son equivalentes a las posiciones 587 y 588 de VAA-2 (Shen *et al.*, 2007). En el caso del control positivo, se observa la banda correspondiente a la proteína VP3 de VAA-2. Como se observa en la figura 27B, la proteína VP3 modificada de VAA-8 tiene mayor peso que la proteína VP3 sin modificación de VAA-2, y esto tiene relación con la predicción con ProtParam tool. Las proteínas VP1, VP2 y VP3 de VAA-2 pesan 87 kDa, 72 kDa, y 62 kDa, respectivamente (Wistuba *et al.*, 1995). El peso de las proteínas VPs de VAA-8 es igual a las de VAA-2 (Merrit *et al.*, 2009). Según la estimación *in silico* del peso de las proteínas VPs, las modificadas pesan 2 kDa más que las nativas; por lo tanto, el peso de las VPs con los 24 aa adicionales para VAA-8 es de 89 kDa, 74 kDa y 64 kDa para VP1 + 24 aa, VP2 + 24 aa y VP3 + 24 aa, respectivamente. La banda de la proteína VP3 aparece más intensa debido a que la relación de la producción de esta proteína es de 10 veces mayor que las otras proteínas VPs (Wistuba *et al.*, 1995). Por otro lado, se observan bandas de menor tamaño en comparación a las VPs, las cuales serían productos de proteólisis, esto se discutirá más adelante en la sección 6.3.2.

Al comparar las figuras 27A y 27B, por un lado, la transfección con 1 µg de b crido recombinante permite obtener mayor cantidad de GP64 en comparación a la transfección con 2 µg, y por otro, ambas transfecciones permiten obtener aparentemente la misma cantidad de VPs modificadas de VAA-8. Una posible explicación de este fenómeno ser a que durante y después del proceso de transfección con 2 µg de b crido, se generaron mutaciones en la secuencia de GP64 que afectar an la estabilidad de la estructura de GP64, lo cual conducir a a su escisión por algún proceso proteolítico; mientras que las secuencias de las VPs no estar an siendo afectadas por mutaciones. Además, en la transfección con 2 µg de b crido, se podrían estar formando partículas virales que incluyeran productos de proteólisis de GP64, las cuales empaquetar an genomas recombinantes y transducir an células de insecto con la misma o similar capacidad de las partículas virales formadas por solo GP64 intacta (Li y Blissard, 2010).

En resumen, se concluye que la transfección fue exitosa, que se est n generando baculovirus recombinantes y que las proteínas VPs recombinantes se est n expresando.

Según el efecto citopático observado en los controles, a mayor número de días post transfección se espera mayor cantidad de progenie viral. Para realizar el ensayo de aislamiento de placas virales y continuar con el proceso de obtención de bacCapMod, se empleó al sobrenadante de la transfección con 1 µg de b crido colectado a los nueve días post transfección. Esto debido a que mostró mayor producción de baculovirus formados con GP64 intacta en comparación al sobrenadante de la transfección con 2 µg de b crido.

6.2.3. Ensayo en placa para aislamiento de placas virales y selección de baculovirus para obtener stock viral

En la figura 28 se muestra el resultado del ensayo en placa para aislamiento de placas de baculovirus a partir de diluciones seriadas del sobrenadante de la segunda generación de baculovirus de la transfección con 1 µg de b crido.



Figura 28. Ensayo en placa para aislar poblaciones clonales de baculovirus bacCapMod. Las placas virales colectadas se señalan con círculos.

En la placa de 6 pozos se sembraron cinco diluciones del baculovirus y un control de células Sf9 sin infectar. En total se colectaron 12 placas virales, se descartó una placa de la dilución 10^{-4} por no colectarse de manera correcta. Entonces, se obtuvieron una placa, una placa, cuatro placas y cinco placas de las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} , respectivamente. Cada placa representa una población clonal de baculovirus, el ensayo en placa permite aislar poblaciones clonales, ya que el agar evita la difusión de baculovirus generado por infección de las células, y de esta manera una población clonal queda confinada en una placa (Gonzalez-Hernandez *et al.*, 2012). Las placas colectadas se propagaron, y en la figura 29 se observa el resultado de Western blot con el AcM B1 para la determinación de la placa que más produce VPs modificadas de VAA-8.

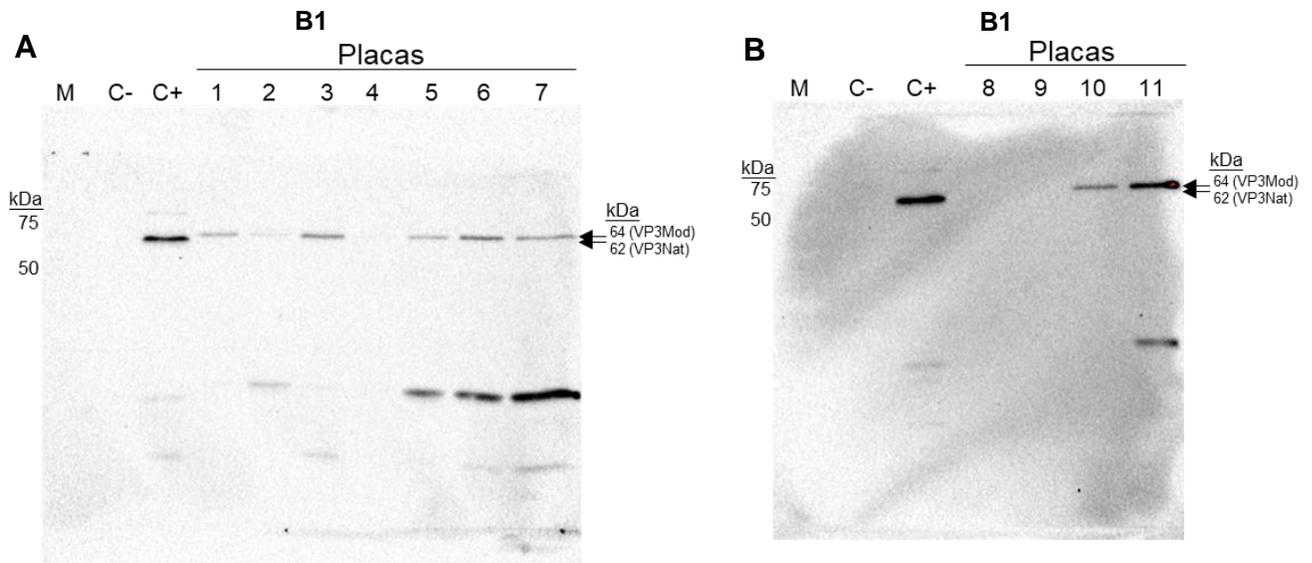


Figura 29. Western blot con el anticuerpo monoclonal B1 para evaluar la expresión de las proteínas estructurales modificadas de virus adeno-asociado del serotipo 8, por las placas virales. La evaluación se realizó en pellet de cultivos de células Sf9 infectadas con las 11 placas virales aisladas. Las placas del 1 al 7 se analizaron en (A), mientras que las 8 al 11, en (B). M: marcador dual color. Control negativo (C-): pellet de cultivo de células Sf9 sin infectar. Control positivo (C+): VP3 de VAA-2 extraído de cultivo de células Sf9. Las flechas señalan a la VP3 modificada (VP3Mod) de 64 kDa y a la VP3 nativa (VP3Nat) de 62 kDa.

En la figura 29 se evidencia que nueve placas expresan VP3. La placa 6 generó el mayor efecto citopático cuando se propagó en células Sf9, mientras que la placa 11 fue una de las más productoras de proteína VP modificada de VAA-8. Lo segundo se deduce al comparar la relación de intensidad entre la banda VP3Mod (64 kDa) y la banda más abundante generada por proteólisis de VPs, ubicada entre 15 kDa y 20 kDa. Por tal motivo, la placa 11 fue seleccionada para amplificarla y obtener los stocks virales pase 1 y pase 2 de baculovirus recombinante bacCapMod.

6.2.4. Amplificación y titulación de baculovirus

Los baculovirus recombinantes bacCap VAA-2, bacRep Cap 2/8 y bacCapMod se amplificaron al infectar cultivos de células Sf9. El baculovirus bacCap VAA-2 pase 2 se amplificó y tituló para obtener un pase 3, bacRep Cap 2/8 pase 1 se usó para obtener un pase 2, y bacCapMod pase 0 se empleó para obtener un pase 1 y posteriormente un pase 2.

Los títulos virales obtenidos para cada baculovirus y cada pase se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Títulos de los stocks de baculovirus recombinantes.

Baculovirus	Número de pase	Título (UFP/mL)
bacCap VAA-2	3	5×10^8
bacRep Cap 2/8	2	1.4×10^9
bacCapMod	1	8×10^7
bacCapMod	2	1×10^9

La amplificación de los stocks de baculovirus es una de las partes más importantes del proceso de producción de proteína recombinante en el SCI-BV. Hay dos problemas que pueden afectar la calidad del stock viral. El primero es la inestabilidad genética y consiste en la pérdida del gen recombinante durante la amplificación de los stocks mediante pases subsecuentes; y el segundo es la aparición de partículas interferentes defectuosas, las cuales tienen deleciones que comprenden hasta el 43% del genoma total, y se acumulan durante la amplificación de los stocks virales. Por lo tanto, se recomienda mantener el número de pase de los stocks virales lo más bajo posible, de preferencia por debajo de un pase 6 (Palomares *et al.*, 2015). Debido a esto, los stocks de trabajo de los baculovirus bacCap VAA-2, bacRep Cap 2/8 y bacCapMod del presente trabajo, tienen un número de pase bajo.

6.3. Producción, purificación y caracterización de cápsides de VAA-8

6.3.1. Producción de cápsides

Para la producción de cada cápside de VAA-8 (nativa o modificada), se emplearon dos matraces de 1 L con cultivos de 250 mL para cada matraz, es decir, 500 mL de cultivo para cada cápside. El resultado de la evaluación, mediante Dot blot, de la

presencia de cápsides y del despliegue del mimótoto en la cápside modificada de VAA-8 se muestra en la figura 30.

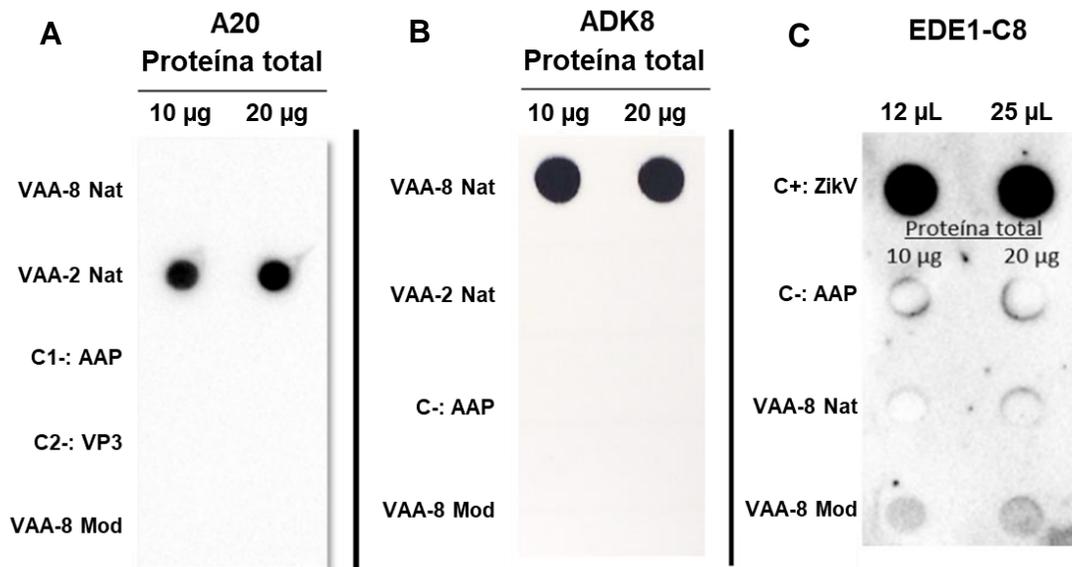


Figura 30. Dot blot con los anticuerpos monoclonales A20, ADK8 y EDE1-C8 para evaluar la presencia de cápsides en los clarificados de pellet celular, y evaluar el despliegue del mimótoto del “epítoto 1 dependiente del dímero de la proteína E” de virus dengue y virus Zika. En (A) se usó el AcM A20, en (B) se usó el AcM ADK8, y en (C) se usó el AcM EDE1-C8. Cápsides/VPs nativas de VAA-8 (VAA-8 Nat), cápsides/VPs nativas de VAA-2 (VAA-2 Nat) y Cápsides/VPs modificadas de VAA-8 (VAA8 Mod): clarificado de células Sf9 infectadas con bacRep Cap 2/8, bacCap VAA-2 y con bacCapMod, respectivamente. Control negativo 1 (C1-) = Control negativo (C-): clarificado de células Sf9 que contiene a la proteína AAP de VAA-2. Control negativo 2 (C2-): clarificado de células Sf9 que contiene a la proteína VP3 de VAA-2. Control positivo (C+): sobrenadante de cultivo de células C6/36 infectadas con ZikV.

A diferencia de la técnica de Western blot empleada en este trabajo, el Dot blot permite detectar epítotos conformacionales debido a que las proteínas no se someten a un proceso de desnaturalización.

En la figura 30A, se observa que el AcM A20 solo reconoció a la muestra correspondiente a VAA-2, este AcM reconoce epítotos conformacionales presentes en la cápside de VAA-2, y no en proteínas VPs sin ensamblar (Chávez, 2011). Además, A20 no presentó reactividad cruzada con epítotos conformacionales formados en la cápside de VAA-8, este resultado concuerda con el reportado por Mietzsch *et al.* (2014). Por lo tanto, se produjeron satisfactoriamente PPV o cápsides

de VAA-2 mediante el sistema células de insecto-baculovirus al emplear el bacCap VAA-2.

Por otro lado, al igual que el AcM A20, el AcM ADK8 reconoce epítomos conformacionales específicos en la superficie de la cápside, y en este caso es específico para VAA-8; no reconoce VPs desensambladas de VAA-8, y no presenta reactividad cruzada con la cápside de VAA-2 (Mietzsch *et al.*, 2014). En la figura 30B, se muestra que el AcM ADK8 reconoce de manera selectiva a la muestra de VAA-8, y no a la de VAA-2. Por otra parte, no se observa señal en los pozos donde se cargaron muestras correspondientes a las VPs/cápsides modificadas de VAA-8; esto se debe a que la inserción de los 24 aa entre los residuos 590 (N) y 591 (T) (posiciones referidas a la proteína VP1 de VAA-8) de las VPs estaría interfiriendo con el principal determinante antigénico del AcM ADK8 (Gurda *et al.*, 2012). Este determinante se ubica en la región variable VIII (VR-VIII) o el bucle (*loop*) IV (segunda protuberancia más alta de las presentes en el eje de simetría triple) de las VPs, el cual se encuentra en la parte externa de las cápsides (Büning y Srivastava, 2019; Shen *et al.*, 2007), y está compuesto por el péptido 586-LQQQNT-591 (posiciones referidas a la proteína VP1 de VAA-8). Por lo tanto, el resultado de la figura 30B confirma que la inserción se realizó en la posición correcta según el diseño del presente trabajo, sin embargo, este resultado no muestra si las VPs modificadas están ensambladas formando cápsides.

Finalmente, se empleó el AcM EDE1-C8 para evaluar el despliegue del mimótopo “HSPLEKPVPHRS” del epítopo EDE1 de DenV y ZikV en las VPs/cápside modificada de VAA-8 (Figura 30C). El anticuerpo reconoció al control positivo (C+) de partículas virales de ZikV, y este resultado concuerda con los reportados en el trabajo de Barba-Spaeth *et al.* (2016). Este AcM también reconoció al mimótopo insertado en las VPs de VAA-8, lo cual nos indica que el mimótopo está siendo desplegado en la conformación correcta sobre las VPs/cápside de VAA-8. Además, este AcM no reconoció a la cápside nativa de VAA-8, por lo que podemos aseverar que la señal observada sobre la muestra VAA-8 Mod, en la figura 30C, se debe a la presencia del mimótopo y no a una reacción cruzada con un epítopo propiamente de la estructura de las cápside de VAA-8. El despliegue en la conformación correcta

del mimótopo sería respaldado por las inserciones de alaninas y glicinas que flanquean a la secuencia del mimótopo, éstas funcionarían como “*linkers*” entre los aa de las proteínas VPs y los aa del mimótopo, lo cual le permitiría independencia estructural al mimótopo y ayudaría a que la estructura de las VPs no se vea afectada por la inserción; ya que las alaninas y glicinas son aa pequeños, y además, las glicinas permiten flexibilidad (Singer *et al.*, 2016).

Con estos resultados, se comprueba que el AcM ADK8 reconoce de manera específica a VAA-8 y que las VPs modificadas presentan al mimótopo desplegado con su estructura conformacional correcta para ser reconocido por el AcM EDE1-C8. Para determinar la formación de cápsides modificadas, las muestras se evaluaron por MET después de ser purificadas (resultados mostrados más adelante en la sección 6.3.3).

6.3.2. Evaluación de proteólisis de las proteínas VPs

Debido a que en los resultados anteriores de Western blot (Figuras 27 y 29) se observan bandas de menor peso molecular con respecto a las proteínas VPs modificadas de VAA-8 (89, 74 y 64 kDa), se decidió evaluar este fenómeno mediante un mapeo con otros anticuerpos, además del AcM B1, que reconocen otros epítomos de las proteínas VPs.

De acuerdo con el diseño del experimento, se planteó evaluar si entre los pases 1 y 2 de baculovirus bacCapMod hay diferencias en cuanto a la presencia de productos de proteólisis de proteínas VPs, si el proceso de extracción de cápsides o proteínas VPs favorece la proteólisis, si los cortes enzimáticos ocurren mayoritariamente en VP1 o VP2 o VP3, y si la proteólisis estuviese generando productos que no contengan el inserto de 24 aa debido al corte cerca al C-terminal de las VPs. En la figura 31 se muestra el resultado de los Western blot empleando los cuatro anticuerpos.

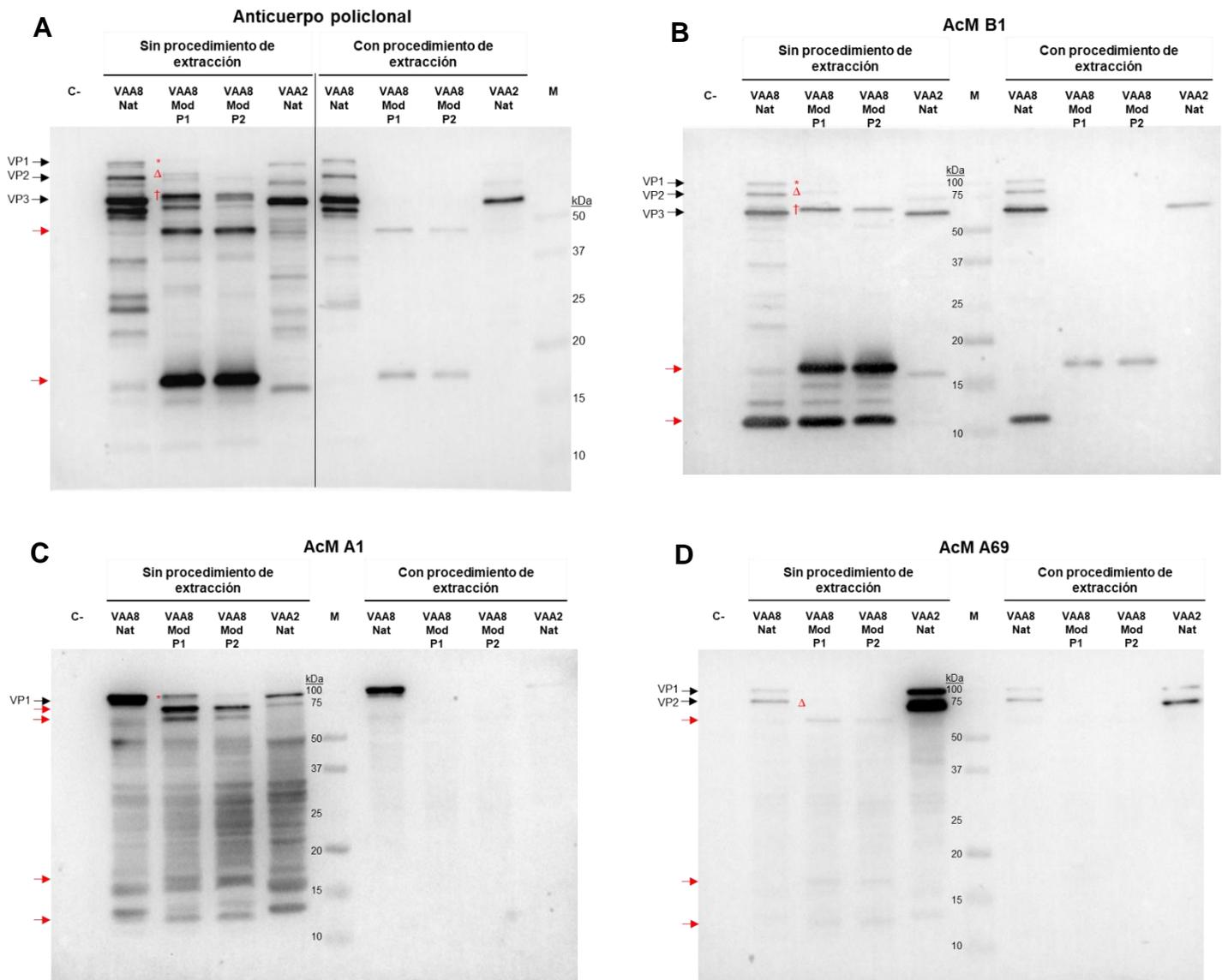


Figura 31. Mapeo mediante Western blot de la proteólisis de las proteínas VPs modificadas de virus adeno-asociado del serotipo 8. En (A) se usó un anticuerpo policlonal que reconoce las tres VPs, en (B) se usó el AcM B1 que también reconoce las tres VPs, en (C) se usó el AcM A1 que reconoce solo a VP1, y en (D) se usó el AcM A69 que reconoce a VP1 y VP2. De (A) a (D), se evaluaron muestras obtenidas sin y con procedimiento de extracción de cápsides/VPs. M: marcador dual color. Control negativo (C-): hemaglutinina del virus de la influenza producida en el SCI-BV, proteínas VPs nativas de VAA-8 (VAA8 Nat), proteínas VPs modificadas de VAA-8 producidas con bacCapMod pase 1 (VAA8 Mod P1), proteínas VPs modificadas de VAA-8 producidas con bacCapMod pase 2 (VAA8 Mod P2), proteínas VPs nativas de VAA-2 (VAA2 Nat). Las flechas negras indican las bandas correspondientes a las proteínas VPs nativas y las flechas rojas a productos de proteólisis de las muestras de VPs modificadas de VAA-8. *VP1 modificada, Δ VP2 modificada y †VP3 modificada.

Como ya se mencionó en 6.2.2, el AcM B1 reconoce un epítipo común entre las tres VPs, el cual se encuentra entre los aa 729 y 736; mientras que el AcM A1 reconoce al epítipo “KRVLEPLGL”, el cual forma parte de la secuencia de VP1 que no es compartida con las otras VPs y se ubica entre los aa 123 y 131 (posiciones

referentes a VP1 del VAA-8, número de acceso: NC_006261.1) (Wobus *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2007). Por otro lado, el AcM A69 reconoce el epítipo “LNFGQTGD**A**DSV” de VAA-2, el cual se ubica entre los aa 171 y 182 (posiciones referentes a VP1 de VAA-2, número de acceso: NC_001401.2) (Wobus *et al.*, 2000); sin embargo, en la posición similar para VAA-8, se encuentra la secuencia “LNFGQTGD**S**ESV” entre los aa 172 y 183 (posiciones referentes a VP1 de VAA-8, número de acceso: NC_006261.1) (Shen *et al.*, 2007).

En la figura 31, no se observan diferencias entre las producciones de VPs modificadas por los pases 1 y 2 del bacCapMod; no hay diferencias entre las VPs obtenidas sin y con el procedimiento de extracción. Aparentemente, se cargó menor cantidad de proteína en los carriles correspondientes a la evaluación con el procedimiento de extracción, pero las bandas más intensas se observan en ambos grupos de muestras.

En la figura 31A, se observa que el anticuerpo policlonal reconoce a las proteínas VPs nativas de VAA-2 y de VAA-8 del tamaño esperado (87, 72 y 62 kDa), y también reconoce a productos de proteólisis de ambos serotipos. Se observan más productos de proteólisis de pesos mayores a 62 kDa para el serotipo 8, lo cual muestra que las proteínas VP1 y VP2 de VAA-8 son más susceptibles a proteólisis que las del serotipo 2. En las muestras de VPs de VAA-8, también se observan bandas más intensas en los productos de proteólisis por debajo de los 62 kDa en comparación a VAA-2. Éstas podrían ser cualquiera de las tres VPs. La susceptibilidad a degradación de las VPs de VAA-8 puede deberse a secuencias específicas en las VPs que son sitios de corte para proteasas, como es el caso del sitio de corte para la catepsina codificada por el baculovirus (v-CATH), ubicado entre los residuos G190 y E191 (posiciones referentes a VP1 de VAA-8, número de acceso: NC_006261.1) (Galibert *et al.*, 2018). Este sitio de corte está presente en la región común entre VP1 y VP2 de VAA-8, pero no en la de VAA-2. Esta susceptibilidad también puede deberse a conformaciones específicas de las VPs de VAA-8 (estructuras secundarias y terciarias), las cuales permitirían el acceso de proteasas como la v-CATH. Galibert *et al.* (2018) reportan un sitio de corte para v-CATH entre los residuos N173 y F174, el cual es conservado entre VAA-2 y VAA-8,

pero solo se observa actividad de v-CATH en VP1 y VP2 de VAA-8, y no sobre las VPs de VAA-2. Para el caso de las proteínas modificadas de VAA-8, el anticuerpo policlonal reconoce a las tres VPs modificadas y también a los productos de proteólisis de las VPs. Se observan dos bandas muy intensas, incluso una es mucho más intensa que las VPs modificadas del tamaño esperado (89, 74 y 64 kDa), éstas son señaladas con flechas rojas en la figura 31, entre los 37-50 kDa y los 15-20 kDa. Estos productos de proteólisis también aparecen en la muestra de VPs nativas de VAA-8, pero con menor intensidad; además, también observan otras bandas que solo aparecen en las muestras de VPs modificadas. Esto puede deberse a que la inserción de los 24 aa afectaría al plegamiento de las VPs, la eficiencia de ensamblaje de partículas de VAA-8 y facilitaría el acceso de algunos sitios para sufrir la actividad de proteasas, esto también podría deberse a que los 24 aa contienen sitios de reconocimiento para alguna proteasa que pueda estar presente en las células Sf9 o sean codificadas por bacCapMod. Con la herramienta *in silico* "PeptideCutter" se pudo identificar sitios de corte dentro de los 24 aa para enzimas como quimiotripsina, proteinasa K, tripsina, entre otras (Anexo 5, Figura A6); y por el lado del SCI-BV, además de la v-CATH codificada por bacCapMod, las células Sf9 producen a las proteasa catepsina B, catepsina L1, enzimas tipo quimiotripsina, entre otros (Anexo 5, Figura A7).

En la figura 31B, se observan bandas correspondientes a las proteínas VPs nativas de VAA-2 y de VAA-8, así como también las VPs modificadas de VAA-8 de los tamaños esperados. Además, se observan dos bandas muy intensas, señaladas con flechas rojas, de productos de proteólisis de VPs modificadas entre los pesos de 15 y 20 kDa, la que corresponde con el peso de la banda más intensa en la figura 31A, y los pesos de 10 y 15 kDa, esta última también se observa en el carril de las VPs nativas de VAA-8. El AcM B1 reconoce un epítipo situado casi en el final del C-terminal de las VPs, por lo tanto, se puede afirmar que esos productos de proteólisis mantienen intacto el epítipo de B1. Para determinar si estos productos de proteólisis podrían haber perdido la secuencia del mimótopo, se estimó cual sería el peso si el corte se hubiese realizado justo antes de la secuencia del mimótopo, iniciando la visualización desde el C-terminal, y el peso estimado fue de 17.1 kDa (154 aa); mientras que, si el corte se hubiese realizado justo después de la

secuencia del mimótopo, el peso sería de 18.4 kDa (166 aa). La banda más intensa de productos de proteólisis se encuentra entre 15 y 20 kDa, y por lo tanto existe la probabilidad de que dicha banda corresponda a un producto de proteólisis que ha perdido la secuencia del mimótopo; y en el caso de la banda intensa de menor peso, se puede afirmar que es un producto de proteólisis que no contiene la secuencia del mimótopo. Por otra parte, con el resultado de la figura 31B, no se puede aseverar si este producto de proteólisis proviene de todas las VPs, de dos o de solo una de ellas.

En la figura 31C, se observan bandas correspondientes a las proteínas VP1 nativas de VAA-2 y de VAA-8, así como también la VP1 modificada de VAA-8 del tamaño esperado. Por otra parte, con flechas rojas se señala a los productos de proteólisis de la proteína VP1 modificada, de éstas destacan dos bandas intensas justo debajo de la VP1 modificada del tamaño esperado (flechas rojas superiores), y al comparar con el carril de VAA-8 nativo, se observa que la más intensa, no aparece. La intensidad de estas bandas indica que existe más productos de proteólisis de VP1 que VP1 modificada del tamaño esperado, mientras que para VAA-8 nativo, la banda más intensa corresponde a la VP1 intacta. Por otro lado, para determinar si alguna de estas dos bandas intensas corresponde a un producto de proteólisis que perdió la secuencia del mimótopo, se estimó cual sería el peso si el corte se hubiese realizado justo antes de la secuencia del mimótopo, iniciando desde el primer aminoácido del N-terminal, y el peso estimado fue de 65.5 kDa (596 aa); mientras que, si el corte se hubiese realizado justo después de la secuencia del mimótopo, el peso sería de 66.9 kDa (608 aa). Por lo tanto, de la figura 31C, se puede mencionar que existe la posibilidad de que esas bandas intensas contengan la secuencia del mimótopo. Por otra parte, se obtienen 53.4 kDa al estimar el peso de la secuencia desde el primer aminoácido del epítipo reconocido por el AcM A1 (posición 123 de VP1) hasta el último aminoácido del mimótopo, y 52 kDa, sin incluir la secuencia del mimótopo; por lo cual, los productos de proteólisis de ~50 kDa a menos, en la figura 31C, han perdido al mimótopo, e incluso se observan dos bandas que solo aparecen en el carril de VAA-8 modificado (flechas rojas inferiores), y la de mayor peso se correspondería con la banda más intensa observada en la figura 31A.

La segunda banda más intensa en la figura 31A no aparece en las figuras 31B y 31C. Este resultado indica que es un producto de proteólisis que perdió los epítomos que reconocen los AcM B1 y A1. Para que esta banda contenga al inserto de 24 aa debería pesar 68.2 kDa, el cual es el peso estimado entre los epítomos que reconocen los AcM B1 y A1; sin embargo, esta banda pesa menos de 50 kDa, por eso, ésta podría o no podría tener el inserto de 24 aa.

Los AcM B1 y A1 reconocen epítomos que se encuentran tanto en VAA-2 como en VAA-8; mientras que el AcM A69 reconoce un epítomo en VAA-2, el cual presenta dos cambios de aa en la secuencia similar en VAA-8 (Wobus *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2007). Por esta razón, en la figura 31D se observa que este AcM no revela bandas intensas en las muestra de VPs de VAA-8. En el caso de las VPs modificadas de VAA-8, se logra observar a VP2 modificada del tamaño esperado, pero en mayor proporción se observan productos de proteólisis que corresponden a las bandas intensas observadas en las figuras 31A, 31B y 31C.

De los resultados de la figura 31, se afirma que el inserto de 24 aa favorece la proteólisis de las proteínas VPs, y que probablemente la mayoría de los productos de proteólisis provienen de VPs que están siendo cortadas en el inserto de 24 aa o en posiciones cercanas a él. Una posible solución para este problema de proteólisis es el uso de inhibidores de proteasas y/o del proteasoma, así como lo hacen en el trabajo de Galibert *et al.* (2018) y en algunos procesos de producción para VAA (Buclez *et al.*, 2016).

6.3.3. Purificación de cápsides de VAA por gradiente de iodixanol

Los métodos más empleados para purificar PPV de VAA son centrifugación en gradientes de densidad y cromatografía (Zolotukhin *et al.*, 1999; Singer *et al.*, 2016; Nieto *et al.*, 2012; Koerber *et al.*, 2007).

Como se menciona en 5.9.3, en el presente trabajo se evaluó un método de centrifugación en gradientes de densidad de iodixanol y dos métodos de cromatografía. El método que nos permitió obtener cápsides modificadas de VAA-8

para emplearlas en la inmunización de ratones fue el de gradientes de iodixanol. Los resultados con este método se muestran a continuación, mientras que los resultados con los métodos de cromatografía se muestran de manera resumida en el anexo 6.

En la figura 32 se muestra el resultado de la centrifugación del gradiente discontinuo de iodixanol para la purificación de las cápsidas nativas de VAA-8 empleando la variante de las proporciones de Zolotukhin *et al.* (1999) y se señalan las fracciones que se colectaron y evaluaron.

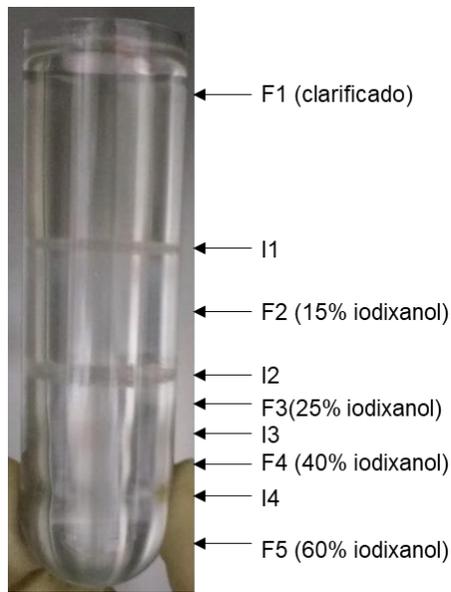


Figura 32. Gradiente de iodixanol empleado para purificar cápsidas nativas de virus adeno-asociado del serotipo 8. Se muestra el tubo después del proceso de centrifugación. Las flechas señalan a las nueve fracciones colectadas (F1, I1, F2, I2, F3, I3, F4, I4 y F5).

En la figura 32, F1 corresponde a la fase en la que se colocó la muestra; I1, a la interfase entre la fracción donde se colocó la muestra y la fracción de iodixanol al 15%; F2, a la fase de iodixanol al 15%; I2, a la interfase entre F2 y la fase de iodixanol al 25%; F3, a la fase de iodixanol al 25%; I3, a la interfase entre F3 y la fase de iodixanol al 40%; F4, a la fase de iodixanol al 40%; I4, a la interfase entre F4 y la fase de iodixanol al 60%; y F5, a la fase de iodixanol al 60%.

Los resultados de SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie, y Western blot para evaluar las fracciones colectadas se muestran en la figura 33.

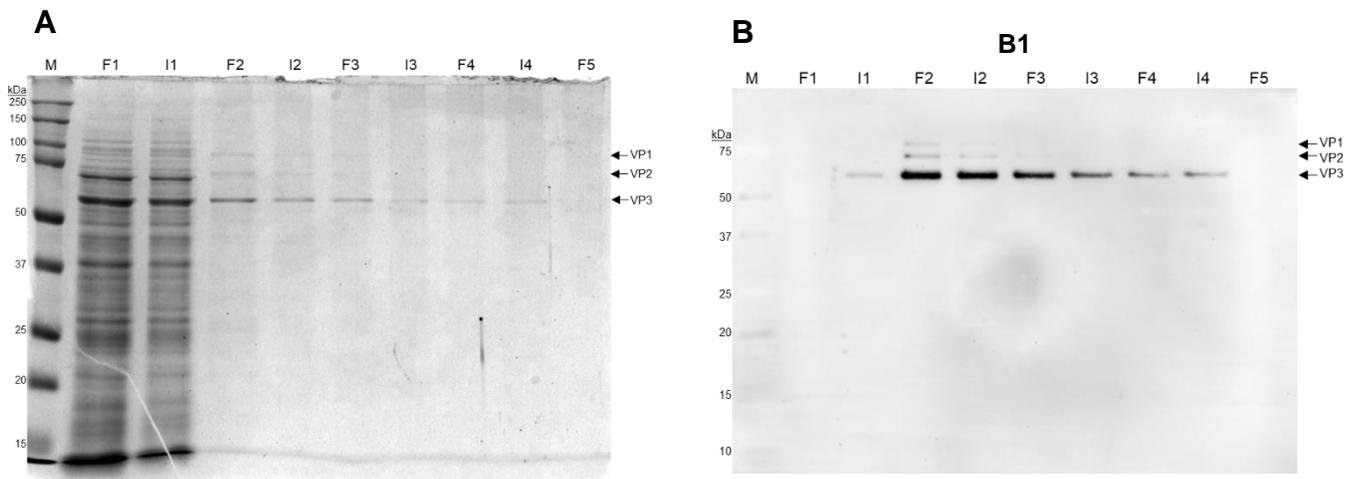


Figura 33. SDS-PAGE y Western blot para evaluación del proceso de purificación por gradiente de iodixanol de cápsidas nativas de virus adeno-asociado del serotipo 8. (A) SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. (B) Western blot con el AcM B1. M: marcador dual color. Fracciones colectadas: F1, I1, F2, I2, F3, I3, F4, I4 y F5. Las flechas señalan a las 3 VPs.

En las figuras 33A y 33B se observa que en las fracciones F2 a la I4 se obtienen VPs con un alto grado de pureza (> 95%). En la fracción F2, que corresponde a la fase de iodixanol al 15%, se obtiene mayor cantidad de proteínas VP1 (87 kDa), VP2 (72 kDa) y VP3 (62 kDa), pero también se observan otras bandas de menor peso.

Después de la ultracentrifugación de cápsidas vacías de VAA por gradientes de iodixanol, éstas suelen encontrarse en una fracción de baja densidad (23-27 % de iodixanol), ya que presentan una densidad de 1.13 g/mL (Chávez, 2011). Se ha reportado que con este método se obtienen cápsidas con una pureza de hasta 99% (Chávez, 2011). Por lo que se espera que en la interfase I3 (fracción de baja densidad), se puedan obtener cápsidas con alto grado de pureza, tal como se observa en la figura 33A.

Para verificar que las VPs estén formando cápsidas, las muestras se analizaron por Dot blot (Figura 34).

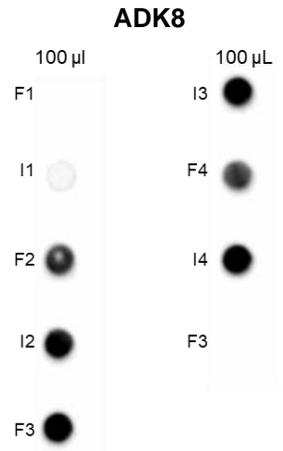


Figura 34. Dot blot con el anticuerpo monoclonal ADK8 para detectar ensamblados en las fracciones colectadas del proceso de purificación por gradiente de iodixanol de cápsides nativas de virus adeno-asociado del serotipo 8.

En la figura 34, se observa señal positiva con el AcM ADK8 desde la fracción F2 hasta la fracción I4. Por lo tanto, se puede afirmar que en estas fracciones hay cápsides nativas de VAA-8. Para visualizar cápsides, la fracción F2 se evaluó por MET (Figura 35). Los resultados de MET confirman la formación de PPV nativas de VAA, a través de la visualización de la estructura icosaédrica, el centro oscuro y el diámetro de ~ 20 nm, los cuales son característicos de estas PPV (Penaud-Budloo *et al.*, 2018).

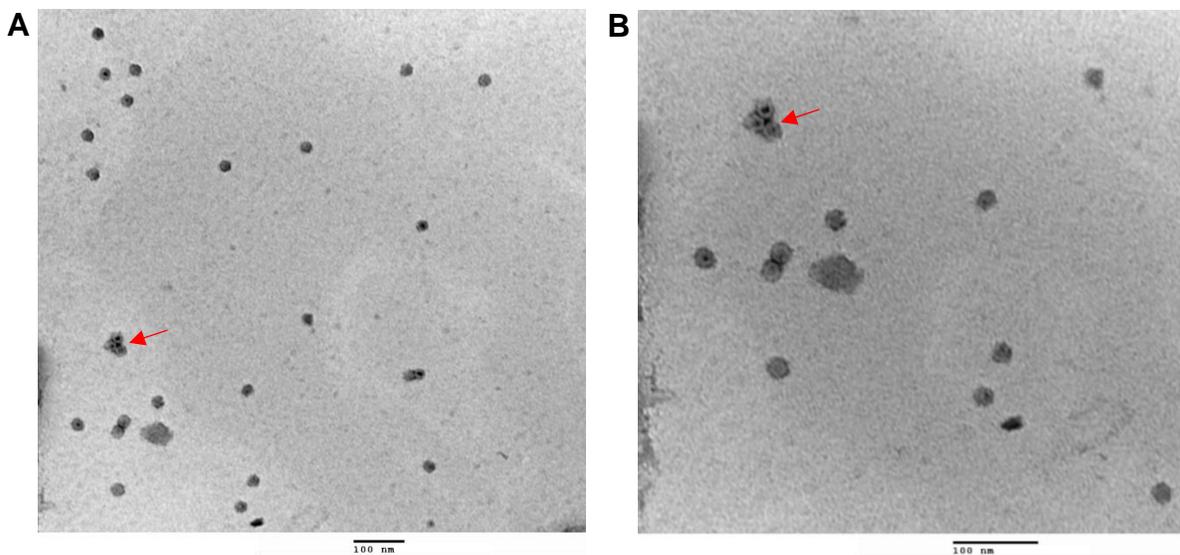


Figura 35. Micrografías de cápsides nativas purificadas de virus adeno-asociado del serotipo 8, obtenidas por microscopía electrónica de transmisión. (A) Cápsides a 120000X. (B) Cápsides a 200000X. Las flechas rojas señalan algunas cápsides ensambladas.

Como se mencionó anteriormente, para la purificación de las cápsides modificadas de VAA-8, primero se evaluaron distintas proporciones del gradiente de iodixanol. Esto se hizo porque los resultados de Western blot en los experimentos de evaluación de proteólisis mostraron altos niveles de VPs modificadas degradadas. En la figura 36 se muestran los tubos con gradientes de iodixanol antes y después de centrifugar.

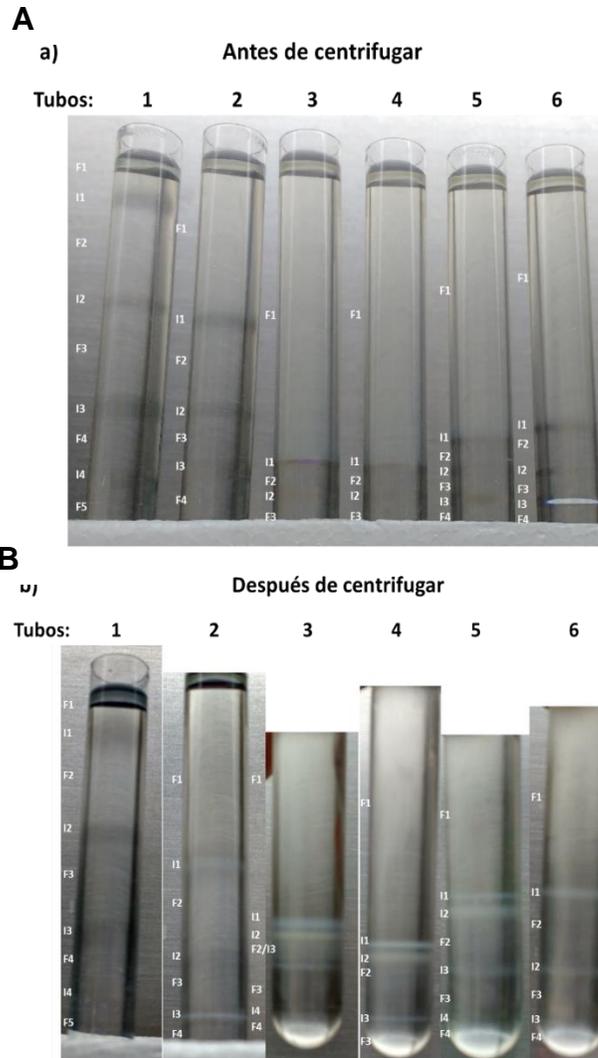


Figura 36. Gradientes de iodixanol empleados para evaluar la composición adecuada para obtener y purificar cápsides modificadas de virus adeno-asociado del serotipo 8, de acuerdo con la tabla 4. (A) Tubos antes de centrifugar. (B) Tubos después de centrifugar. Las distintas fracciones se indican con letras y números a su lado izquierdo, y éstas son F1, I1, F2, I2, F3, I3, F4, I4 y F5. En el tubo 3, después de centrifugar, las fracciones F2 e I3 se mezclaron y se denominaron F2/I3.

En la figura 36, se muestra la acumulación de material en las interfases. Todas las fracciones colectadas de cada tubo se evaluaron por SDS-PAGE y tinción con nitrato de plata, y por Western blot empleando los AcM B1 y AcV5. De estas evaluaciones, la variante “Nueva 2”, la cual corresponde al tubo 5, resultó la más adecuada para obtener cápsides modificadas. Por lo tanto, a continuación, solo se muestra la evaluación del tubo que usa la variante del método de Zolotukhin *et al.* (1999), como control, y de la variante “Nueva 2”. Para el tubo 2 (variante de Zolotukhin), F1 corresponde a la fase en la que se colocó la muestra; I1, a la interfase entre la fracción donde se colocó la muestra y la fracción de iodixanol al 15%; F2, a la fase de iodixanol al 15%; I2, a la interfase entre F2 y la fase de iodixanol al 25%; F3, a la fase de iodixanol al 25%; I3, a la interfase entre F3 y la fase de iodixanol al 40%; F4, a la fase de iodixanol al 40%; también se colectaron I4, interfase entre F4 y la fase de iodixanol al 60%, y F5, fase de iodixanol al 60%, aunque éstas no se observen en la figura. Para el tubo 5 (variante “Nueva 2”), F1 corresponde a la fase en la que se colocó la muestra; I1, a la interfase entre la fracción donde se colocó la muestra y la fracción de la mezcla de iodixanol al 15 y 25%; I2, a una segunda interfase entre la fracción donde se colocó la muestra y la fracción de la mezcla de iodixanol al 15 y 25%; F2, a la fase de la mezcla de iodixanol al 15 y 25%; I3, a la interfase entre F2 y la fase de iodixanol al 40%; F3, a la fase de iodixanol al 40%; I4, a la interfase entre F3 y la fase de iodixanol al 60%; y, F4, a la fase de iodixanol al 60%.

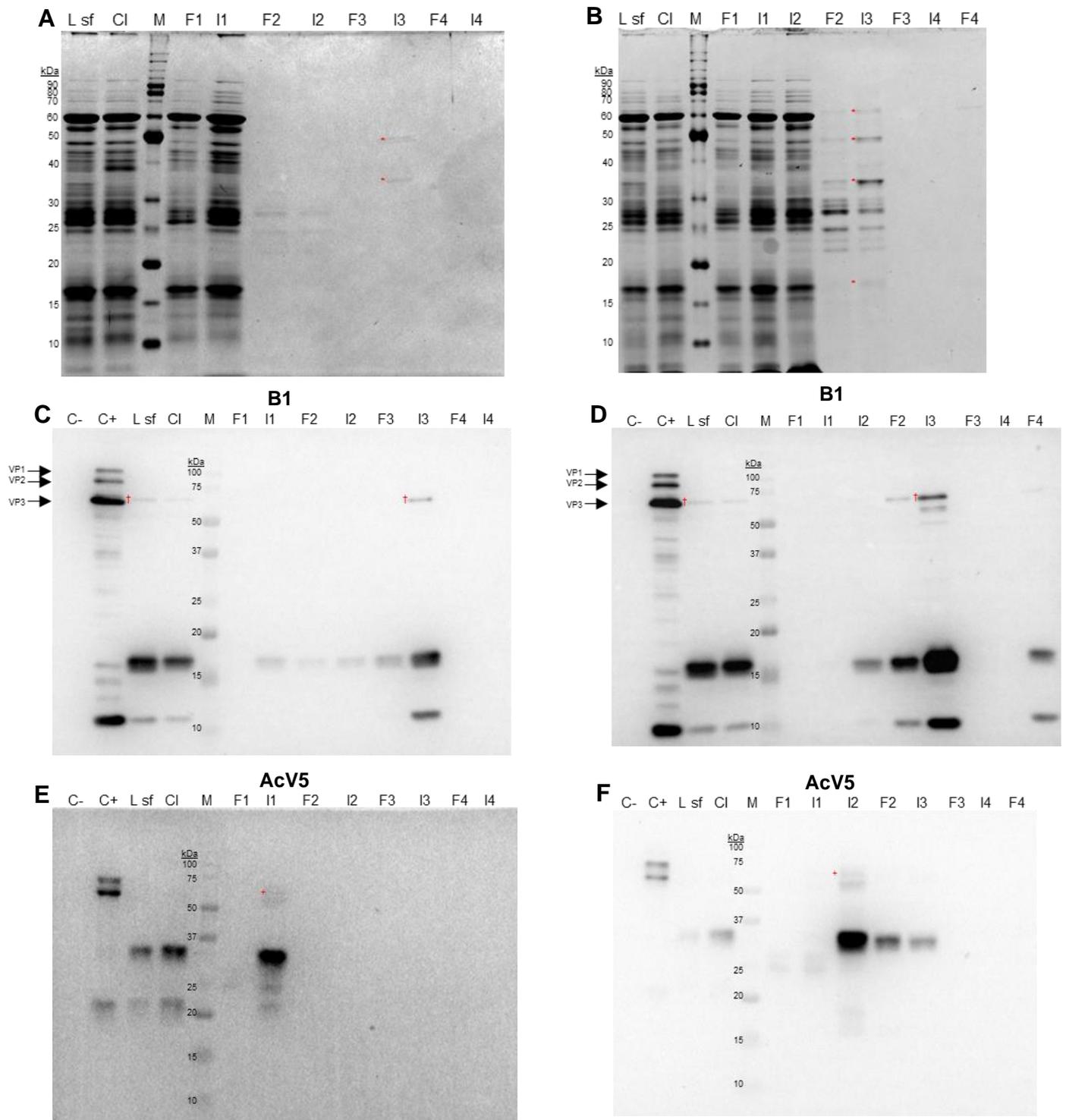


Figura 37. SDS-PAGE y Western blot para evaluación del proceso de purificación por gradiente de iodixanol de cápsidas modificadas de virus adeno-asociado del serotipo 8. (A), (C) y (E) son la evaluación a través de SDS-PAGE y tinción con nitrato de plata, Western blot con el AcM B1 y Western blot con el AcM AcV5 de las fracciones del tubo 2 (variante de Zolotukhin), respectivamente. (B), (D) y (F) son la evaluación a través de SDS-PAGE y tinción con nitrato de plata, Western blot con el AcM B1 y Western blot con el AcM AcV5 de las fracciones del tubo 5 (variante "Nueva 2"), respectivamente. En (A) y (B), los * indican que dichas bandas podrían corresponder a VPs. En (C) y (D), las flechas señalan a las VPs nativas de VAA-8, y los † indican a la proteína VP3 modificada. En (E) y (F), los + indican la presencia de la proteína GP64 del baculovirus. En los SDS-PAGE, M:

marcador Benchmark; y en los Western blot, M: marcador dual color. Control negativo (C-): hemaglutinina del virus de la influenza producida en el SCI-BV, control positivo (C+): clarificado de células Sf9 infectadas con bacRep Cap 2/8, lisado sin filtrar y clarificado de células Sf9 infectadas con bacCapMod (L sf y CI, respectivamente). Las distintas fracciones se indican como F1, I1 hasta la F4 e I4.

En la figura 37 se muestra que los resultados entre el uso de las proporciones de la variante Zolotukhin y la variante “Nueva 2” son similares, pero la diferencia principal radica en la cantidad de muestra colocada en el tubo. En la variante de Zolotukhin se colocaron 5.13 mL, mientras que en la variante “Nueva 2”, 8.66 mL, es decir 1.69 veces más; lo cual resultó en mayor acumulación de cápsides en la fracción de interés I3 del tubo de la variante “Nueva 2”, en comparación a la fracción I3 de la variante de Zolotukhin. Esto se puede comprobar al comparar los carriles de las fracciones I3 de las figuras 37C y 37D. Al observar los geles de las figuras 37A y 37B, en dichos carriles aparecen más bandas que las observadas en los resultados de Western blot de las figuras 37C y 37D. Esto podría indicar que las VPs de dichas fracciones no tienen un alto grado de pureza o que muchas de las bandas en los geles son productos de proteólisis que perdieron el extremo C terminal que contiene el epítipo para el AcM B1, y, por ende, no son observadas en las figuras 37C y 37D. Para el carril de la fracción I3, la banda marcada con el * entre los 15 y 20 kDa en el gel de la figura 37B podría corresponder a la banda más intensa que se observa entre los 15 y 20 kDa del carril de la fracción I3 (figura 37D). Esto indica que hay ensamblados que podrían estar formándose con los productos de proteólisis, o que la actividad proteolítica sucedió después del ensamblaje. Por otro lado, los resultados mostrados en las figuras 37E y 37F indican que la proteína GP64 de baculovirus se encuentra presente en la fracción I3 de la variante “Nueva 2”, pero no en la fracción I3 de la variante de Zolotukhin, esto tal vez porque “Nueva 2” tenía más proteína en comparación a la variante Zolotukhin, lo cual permitió la detección de GP64 en I3. No fue posible calcular el grado de pureza de las proteínas VPs/cápsides modificadas de VAA-8 al no poder identificar a las VPs y sus productos de proteólisis. Sin embargo, al comparar las fracciones I3 con las fracciones F1, I1 e I2 se puede notar que mucha proteína no deseada fue removida, incluyendo parte de la GP64. Posteriormente, las fracciones de interés I3 y F2 de la variante “Nueva 2” se evaluaron por MET (Figura 38).

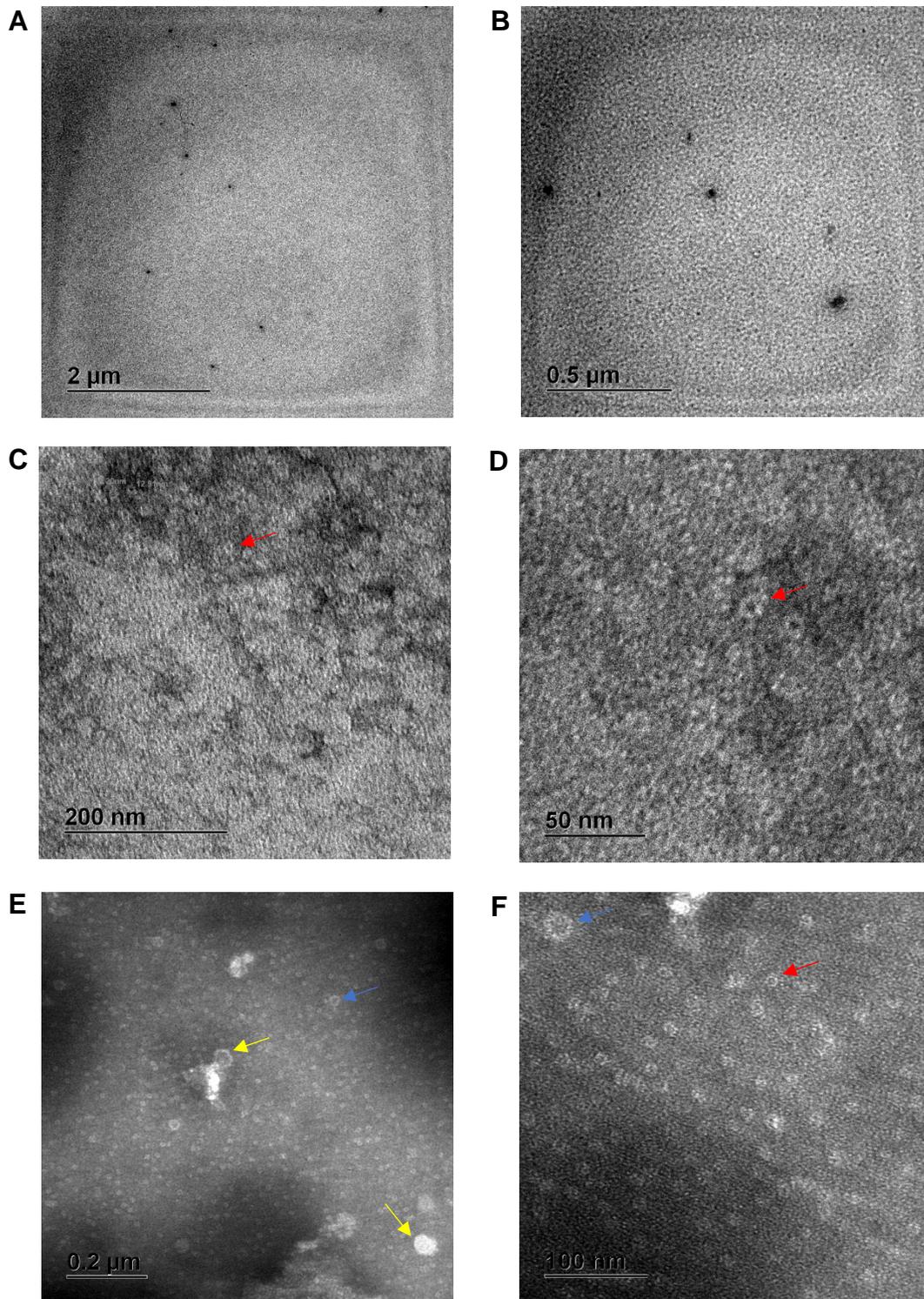


Figura 38. Micrografías de cápsides modificadas purificadas de virus adeno-asociado del serotipo 8, obtenidas por microscopía electrónica de transmisión. (A) y (B) corresponden a la fracción I3 (interfase entre 25-40% de iodixanol) del tubo 2 (variante Zolotukhin). (A) Aumento de 4000X. (B) Aumento de 12600X. (C) y (D) corresponden a la fracción F2 (mezcla entre fases 15 y 25% de iodixanol) del tubo 5 (variante “Nueva 2”). (C) Aumento de 40000X. (D) Aumento de 100000X. (E) y (F) corresponden a la fracción I3 (interfase entre F2 y 40% de iodixanol) del tubo 5. (E) Aumento de 20000X. (F) Aumento de 50000X. Las flechas señalan algunos ensamblados.

En la figura 38, se observan estructuras con apariencia de cápsides en las muestras de la variante “Nueva 2”, mientras que para la variante de Zolotukhin no se encontraron ensamblados. Las estructuras observadas son de ~10 nm (flechas rojas en la Figura 38), de ~20 nm (flechas azules en la Figura 38) y de ~60 nm (flechas amarillas en Figura 38E). El tamaño de las cápsides nativas de VAA es de ~20 nm (Penaud-Budloo *et al.*, 2018); sin embargo, éstas pueden fragmentarse y formar agregados multiméricos (Horowitz *et al.*, 2013), las cuales podrían ser las estructuras observadas en la figura 38E; por otro lado, las muestras de VAA podrían estar contaminadas o mantener residuos de proteasomas (Vironova, s.f.), y este podría ser el caso de las estructuras de ~10 nm observadas en la figura 38.

La fracción I3 de la variante “Nueva 2” fue seleccionada para los siguientes experimentos, ya que se encontraron ensamblados (Figuras 38E y 38F), y que los resultados de las figuras 37 muestran mayor abundancia de VPs y menor cantidad de GP64 en esta fracción.

En la figura 39 se muestra la curva estándar construida para calcular la densidad de la fracción I3, y con esto, calcular la densidad de las partículas en dicha fracción.

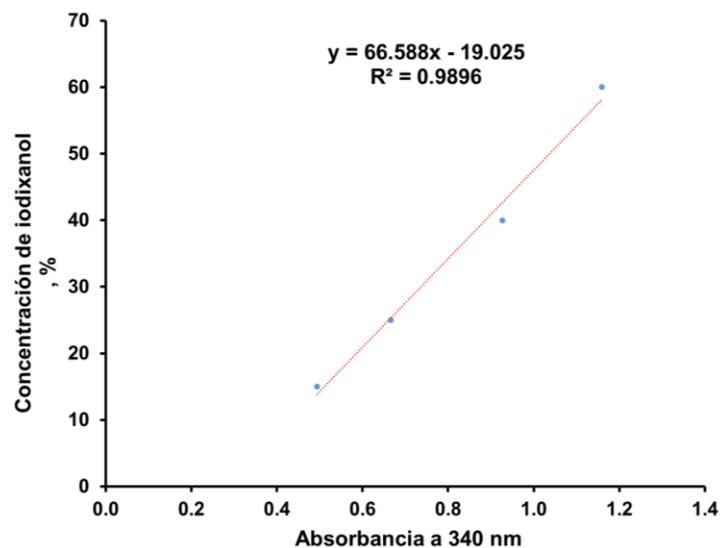


Figura 39. Curva estándar para calcular la densidad de las partículas en la fracción I3.

El porcentaje de iodixanol de la fracción I3 se calculó con la ecuación de la recta de la figura 39. El porcentaje calculado fue de 30.83%. Este valor fue reemplazado en la ecuación 5 descrita en la sección de materiales y métodos. La densidad obtenida fue de 1.15 g/mL. Esta densidad es muy cercana a la reportada para cápsides nativas vacías (1.13 g/mL) (Chávez, 2011).

Posteriormente, se emplearon las proporciones de la variante “Nueva 2” para purificar más cápsides nativas y modificadas en tubos de 38 mL de capacidad nominal. En la figura 40 se muestra un tubo después de centrifugar.

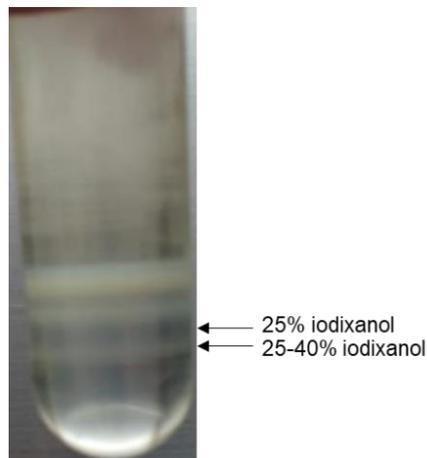


Figura 40. Gradiente de iodixanol con proporciones de la variante “Nueva 2”. Se muestra un tubo de 38 mL de capacidad nominal. La fase de iodixanol al 25% y la interfase entre las fracciones de iodixanol al 25% y al 40% se señalan con flechas.

En la figura 40, se observa la acumulación de material en las interfases. Todas las fracciones se colectaron y se evaluaron por SDS-PAGE con tinción con nitrato de plata y por Western blot con el AcM B1. Los resultados obtenidos fueron similares a los observados en la figura 37 para fracciones de la variante “Nueva 2” (resultados no mostrados). Para la obtención de cápsides nativas y modificadas, la fracción colectada fue la interfase entre 25% y 40%, la cual se concentró y se le intercambió de solución a PBS. Luego, las muestras purificadas y concentradas fueron evaluadas por Dot blot y MET, y los resultados de estos experimentos se muestran en las figuras 41 y 42.

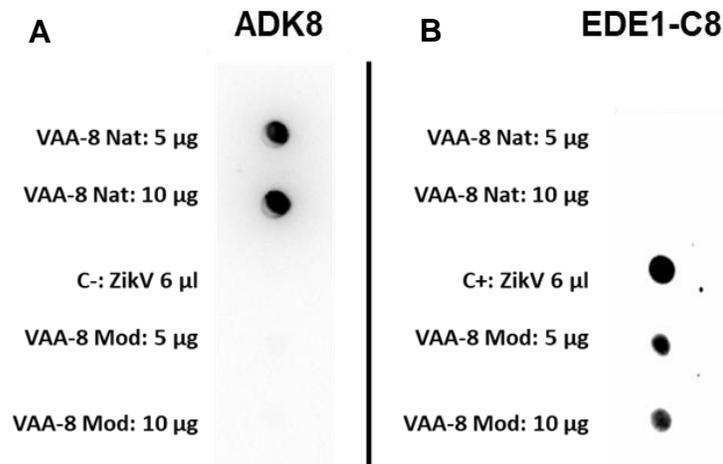


Figura 41. Dot blot con los anticuerpos monoclonales ADK8 y EDE1-C8 para detectar cápsides en las muestras purificadas y concentradas, y evaluar el despliegue del mimótipo del “epítipo 1 dependiente del dominio de la proteína E” de virus dengue y virus Zika. En (A) se usó el AcM ADK8 y en (B) se usó el AcM EDE1-C8. Cápsides nativas de VAA-8 (VAA-8 Nat) y cápsides modificadas de VAA-8 (VAA8 Mod). Control negativo (C-) = sobrenadante de cultivo de células C6/36 infectadas con ZikV. Control positivo (C+) = C-.

En la figura 41, se observa la presencia de cápsides nativas de VAA-8 con el AcM ADK8, y el reconocimiento del mimótipo del epítipo EDE1 por el AcM EDE1-C8, en las muestras purificadas y concentradas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos con clarificados en la figura 30.

Los resultados obtenidos en la figura 42A son similares a los obtenidos en la figura 35, esto indica que se pueden obtener cápsides nativas de VAA-8 con las proporciones de la variante Zolotukhin o con las de la variante “Nueva 2”. Para el caso de las cápsides modificadas de VAA-8, en las figuras 42B y 42C, se observan diferentes ensamblados, como se muestra en la figura 38.

Es probable que los ensamblados de ~20 nm estén formados por las tres VPs modificadas, o por solo VP3 modificada, de manera similar a lo observado por Nieto *et al.* (2012). Como se mencionó en la sección de antecedentes para andamios de VAA, todos los estudios de despliegue de péptidos con fines de inducir una respuesta inmune se han realizado en el serotipo 2 de este virus, y las cápsides modificadas han sido generadas solo con VP3 (Nieto *et al.*, 2012; Manzano-Szalai *et al.*, 2014; Jagu *et al.*, 2015; Singer *et al.*, 2016).

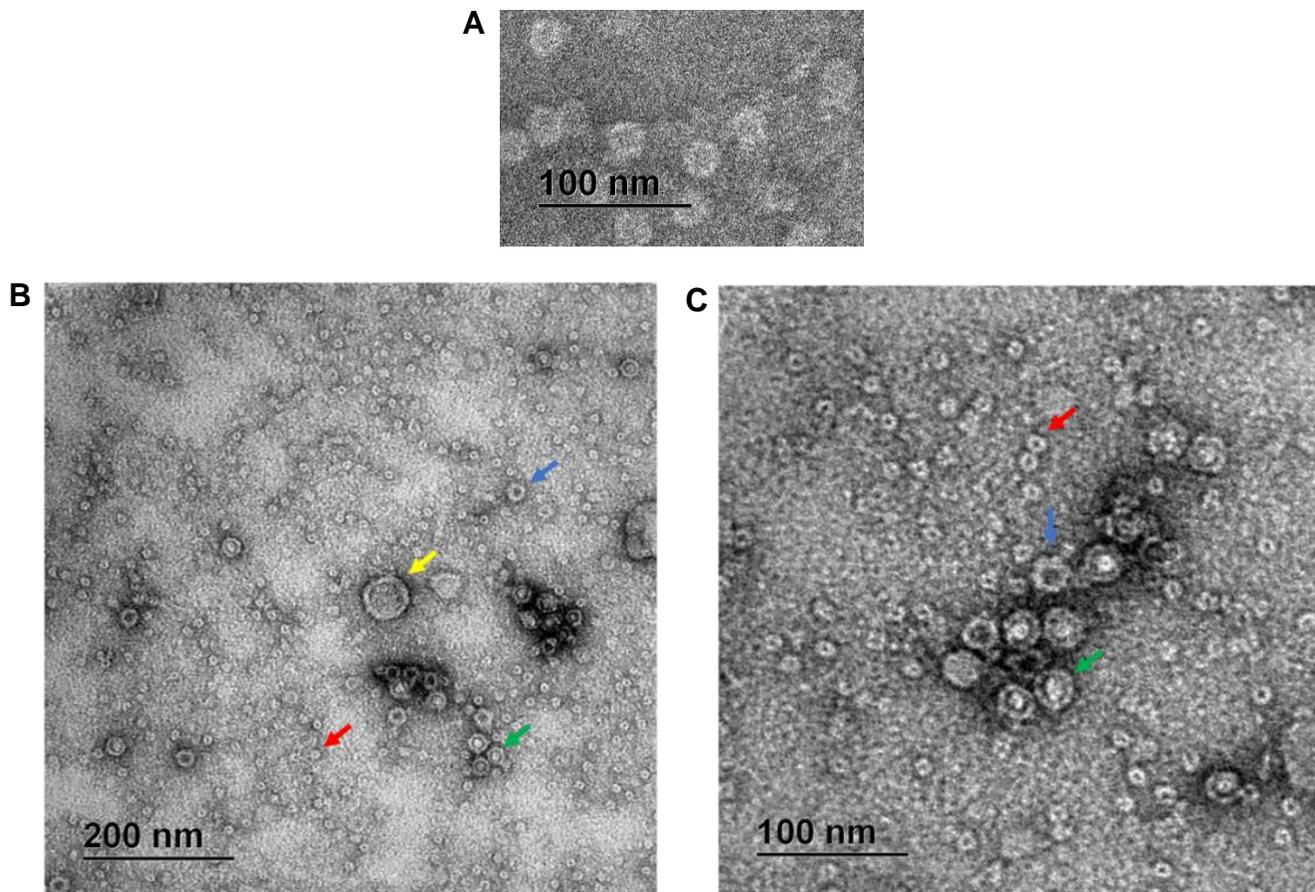


Figura 42. Micrografías de ensamblados de virus adeno-asociado del serotipo 8 nativo y modificado, obtenidas por microscopía electrónica de transmisión. Se muestran los ensamblados que se obtuvieron después del proceso de purificación con las proporciones de iodixanol de la variante “Nueva 2”. (A) Cápsidas nativas de VAA-8 a 50000X. (B) Ensamblados de VAA-8 modificado a 25000X. (C) Ensamblados de VAA-8 modificado a 50000X. Con respecto a los ensamblados modificados, las flechas rojas señalan a los ensamblados proteicos de ~10 nm, las azules, a los de ~20 nm, las amarillas, a los de ~62 nm, y las verdes, a los de ~20 nm que parecen contener a los de ~10 nm en su interior.

De igual manera que en la figura 38, en la figura 42, se observan ensamblados de ~10 nm, ~20 nm y ~60 nm en las muestras purificadas correspondientes a las VPs modificadas de VAA-8. Para una mayor caracterización de los ensamblados de VPs modificadas, las muestras se analizaron a través de criome.

El análisis se enfocó en determinar la estructura de las partículas de ~20 nm, para esto se preseleccionaron 31745 partículas de ~20 nm, se conservaron 1768 imágenes de un total de ~1900, se importaron 14904 partículas y se seleccionaron 5719 partículas para generar el mapa de densidad electrónica de la cápside

modificada de VAA-8. En la figura 43 se muestran los resultados del análisis a través de criome.

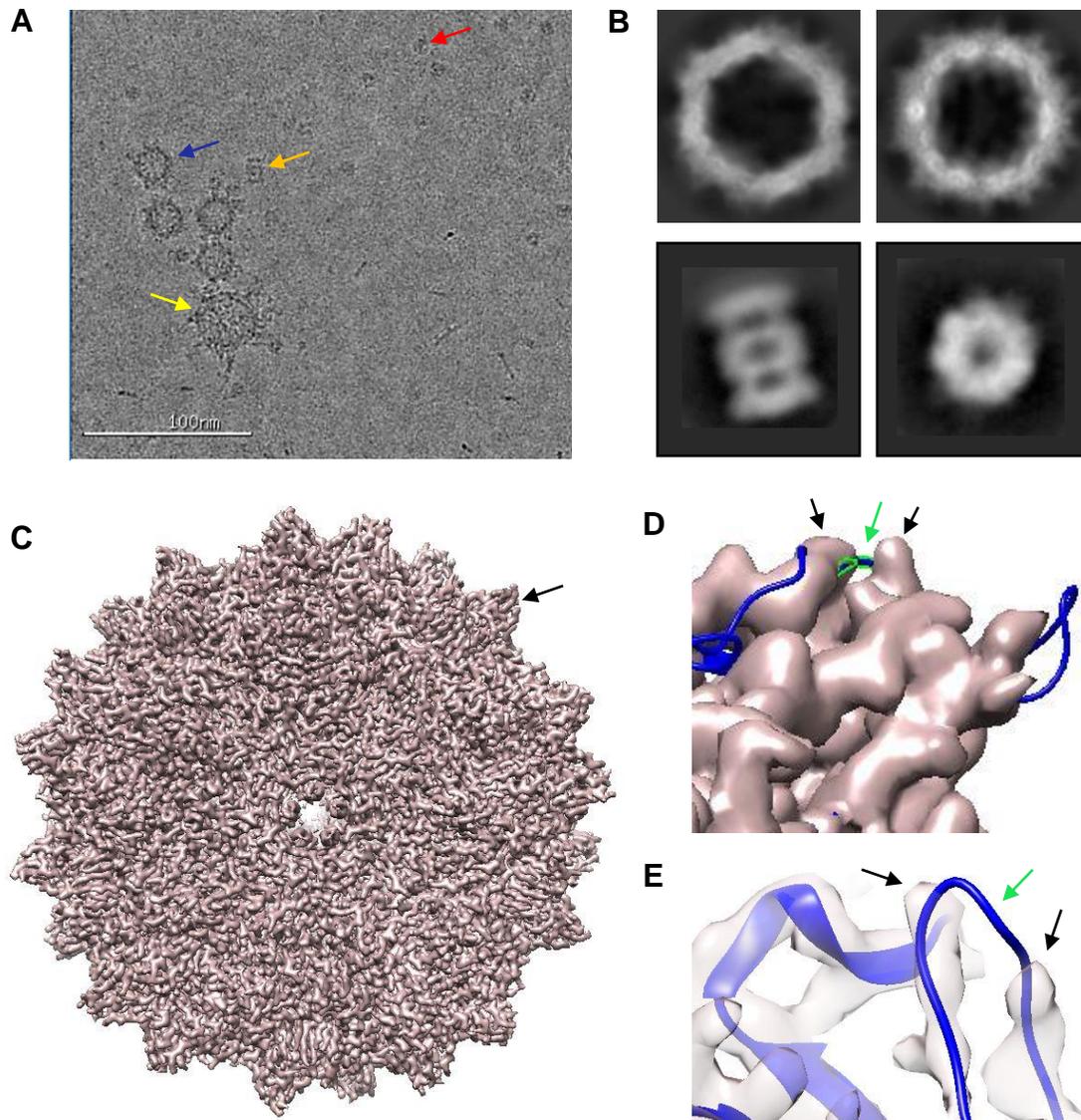


Figura 43. Micrografía y mapa de densidad electrónica de virus adeno-asociado del serotipo 8 modificado, obtenidos por criomicroscopía electrónica. (A) Ensamblados de VPs modificadas de VAA-8 a 22500X. La flecha roja señala un ensamblado de ~10 nm, la azul, uno de ~20 nm, la amarilla, uno de ~35 nm, y la naranja, un proteasoma. (B) Cápsides modificadas de VAA-8 (~20 nm) en la parte superior, un proteasoma en la parte inferior izquierda y un ensamblado de ~10 nm en la parte inferior derecha. (C) Mapa de densidad electrónica de la cápside modificada de VAA-8 (~20 nm). La flecha negra señala uno de los bucles donde se despliega el mimótopo. (D) y (E) Alineamiento entre la estructura de la cápside nativa de VAA-8 (6UBM) (azul) y el mapa de densidad electrónica de la cápside modificada de VAA-8 (palo rosa). Las flechas negras señalan la estructura correspondiente al bucle donde se insertó el mimótopo en la cápside modificada de VAA-8 y las flechas verdes señalan el bucle en la cápside nativa de VAA-8.

Al igual que en los resultados de MET (Figuras 38 y 42), en la micrografías obtenidas por criome también se observan partículas de un tamaño distinto al de ~20 nm. En la figura 43B, se observa un proteasoma y un ensamblado de ~10 nm. Como se mencionó anteriormente (Vironova, s.f.), la estructura de ~10 nm podría ser un proteasoma, en este caso, visto desde arriba. Sin embargo, existe la posibilidad de que se trate de una estructura diferente a un proteasoma debido a su abundancia en la muestra (Figuras 38, 42 y 43). Se requiere un mayor análisis para determinar la identidad de esas estructuras.

Por otro lado, en la figura 43C se muestra el perfil de la cápside modificada de VAA-8 (~20 nm) con base en su mapa de densidad electrónica. El mapa de densidad electrónica en formato mrc, y un video sobre el perfil de la cápside modificada y el acercamiento sobre la posición del mimótopo se encuentran en el enlace <https://drive.google.com/drive/u/4/folders/1pEgjtL-jSy0bm5laGleA5AFu6KOLdlj6>.

La resolución global del mapa de densidad corregido es de 2.65 Å (Anexo 7, Figura A10). El mapa obtenido (archivo mrc) se alineó con la estructura de la cápside nativa de VAA-8 (6UBM, archivo pdb), y con esto, se verificó la estructura típica de los VAA en la estructura de la cápside modificada. Sin embargo, no se logró determinar la estructura del inserto entre los residuos 590 y 591 de la cápside de VAA-8 (posiciones referentes a VP1 de VAA-8, número de acceso: NC_006261.1) (Figuras 43D y 43E). Esto se debe a que los “*linkers*” de glicina y alanina le otorgan flexibilidad al inserto sobre toda la estructura de la cápside de VAA-8, lo cual dificulta la obtención su estructura a través de criome (Zhao *et al.*, 2019). En las figuras 43E y 43D, se observa que la estructura 6UBM, la cual corresponde a la cápside nativa de VAA-8, presenta al bucle IV completo (azul), mientras que el mapa de densidad electrónica de la cápside modificada no contiene la estructura completa del bucle IV (palo rosa).

El presente trabajo representa el primer reporte del despliegue de péptidos con fines inmunogénicos en la cápside de VAA-8, y empleando las tres VPs. Se requiere mayor caracterización para determinar si las estructuras que se muestran en las figuras 38, 42 y 43 están formadas solo por alguna de las VPs, por dos de ellas, o

por las tres, o si las estructuras están formadas por productos de proteólisis de VPs que contienen o no al mimótopo.

Además, es importante evaluar la formación de cápsides de VAA-8 con solo VP3 modificada, ya que, al producir solo VP3 modificada, se evitaría la presencia de los productos de proteólisis de VP1 y VP2 (Galibert *et al.*, 2018), y también, podría evitarse la proteólisis de VP3 modificada, si es que la presencia de VP1 y VP2 modificadas afecta su conformación y permite el acceso de proteasas a sitios de corte en VP3 (Galibert *et al.*, 2018; Rayaprolu *et al.*, 2013). No obstante, se debe tener en cuenta que al generar el sistema de expresión de solo VP3, se estaría removiendo parte de la secuencia inicial para expresar a la proteína AAP. Por lo tanto, se requeriría la coexpresión de AAP en otro casete de baculovirus, ya que VAA-8 requiere de la proteína AAP para poder ensamblar cápsides (Maurer *et al.*, 2019).

Por otro lado, estudios previos indican que la posición elegida para la inserción de péptidos, en el caso de VAA-2, acepta hasta 34 aa sin interferir con la formación de cápsides; mientras que para VAA-8, esa posición (entre los residuos 590 y 591) ha sido evaluada hasta con inserciones de 7 aa (Büning y Srivastava, 2019). En el presente proyecto, la inserción de los 24 aa está vinculada con la proteólisis de VPs, lo cual podría interferir con la formación de cápsides; sin embargo, no se sabe si la longitud del inserto sea el factor responsable de este evento.

De lo mencionado, también es importante evaluar otras longitudes de insertos y otras secuencias, ya que algunas secuencias podrían contener sitios de corte para proteasas producidas en el SCI-BV, como las encontradas en el inserto del presente trabajo.

En la actualidad, no hay reportes de estructuras de cápsides modificadas de VAA-8. Durante este trabajo se logró obtener el mapa de densidad electrónica correspondiente a la cápside modificada de VAA-8, pero no se logró resolver la estructura de las inserciones de 24 aa, por lo tanto, no se procedió a generar el modelo de la estructura completa de la cápside modificada.

Como se mencionó anteriormente, VAA-2 es el serotipo más explorado con respecto a su uso en biotecnología. Por otra parte, el uso de otros serotipos de VAA puede representar una ventaja con respecto al tropismo de VAA-2, ya que cada serotipo de VAA presenta tropismo específico (Büning y Srivastava, 2019). En aplicaciones futuras, la cápside modificada de VAA-8 desarrollada durante este trabajo podría usarse para la entrega de algún cargo a un órgano específico para el que VAA-2 no presenta tropismo.

6.4. Producción de DenV-2 y de ZikV

6.4.1. Propagación de DenV-2 y ZikV

Stocks de DenV-2 y ZikV se propagaron con el objetivo principal de ser usados para sensibilizar placas de 96 pozos para la prueba de ELISA y detectar anticuerpos contra el epítipo EDE1-C8 en los sueros de ratones inmunizados. Con la finalidad de reducir la presencia de BSA en los stocks de DenV-2 y ZikV, estos virus se propagaron en células C6/36 en medio EMEM sin SFB; ya que, el BSA podría interferir en los resultados de la prueba de ELISA a través de señales no específicas (Xiao y Isaacs, 2012). En el suero pueden existir anticuerpos que presentan reactividad cruzada con el BSA (Konishi *et al.*, 2010; Chart *et al.*, 1998).

En las figuras 44 y 45 se muestran cultivos infectados por estos *Flavivirus* y el resultado de la prueba de Dot blot para identificar la presencia de partículas virales, respectivamente.

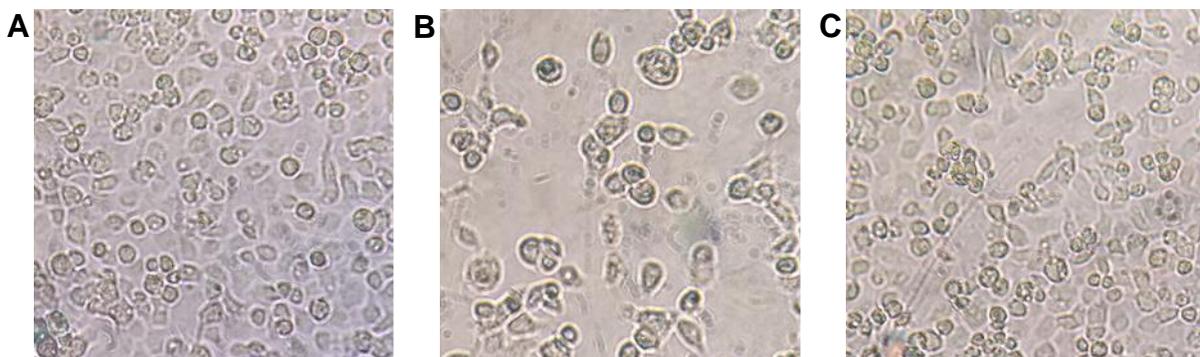


Figura 44. Células C6/36 sin infectar e infectadas con virus dengue del serotipo 2 o virus Zika. (A) Células C6/36 sin infectar, a 300X y 72 horas de cultivo después de alcanzar la confluencia. (B) Células C6/36 infectadas con DenV-2, a 350X y 72 horas post infección. (C) Células C6/36 infectadas con ZikV, a 300X y 72 horas post infección.

En la figura 44, se puede observar que después de 72 hpi, las células C6/36 sin infectar (Figura 44A) y las infectadas con ZikV (Figura 44C) se mantienen formando una monocapa confluyente, mientras que muchas de las células infectadas con DenV-2 (Figura 44B) se han despegado del frasco T. Estos resultados concuerdan con los reportados por trabajos como los de Offerdah *et al.* (2017) y Teramoto *et al.* (2019), en donde no se observa desprendimiento de la monocapa ni efecto citopático en células C6/36 infectadas por ZikV, incluso a las 120 hpi; mientras que para las células C6/36 infectadas con DenV-2, se observa desprendimiento de la monocapa y formación de sincitios a las 72 hpi.

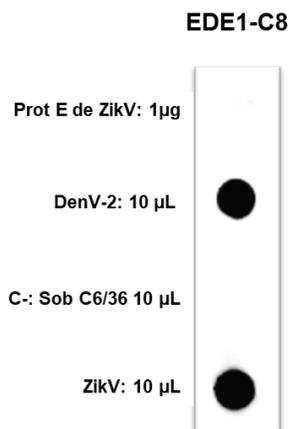


Figura 45. Dot blot con el anticuerpo monoclonal EDE1-C8 para detectar partículas de virus dengue y virus Zika. Prot E de ZikV: monómero de proteína E recombinante de ZikV. DenV-2: sobrenadante de cultivo de células C6/36 infectadas con DenV-2. Control negativo (C-): sobrenadante de cultivo de células C6/36. ZikV: sobrenadante de cultivo de células C6/36 infectadas con ZikV.

En la figura 45, se puede observar que el AcM EDE1-C8 reconoce a ambos *Flavivirus*, tal como se reporta en Barba-Spaeth *et al.* (2016). El epítipo reconocido por el AcM EDE1-C8 es dependiente del dímero de la proteína E presente en las partículas virales de ambos virus; y debido a eso, el AcM EDE1-C8 no reconoce a

la proteína E monomérica (Prot E de ZikV) (Dejnirattisai *et al.*, 2015; Barba-Spaeth *et al.*, 2016).

Con los resultados de cultivos celulares infectados y de Dot blot, se logró comprobar la propagación de ambos *Flavivirus*.

Se realizaron varias propagaciones con el propósito de obtener suficiente cantidad de ambos virus para las inmunizaciones y la sensibilización de placas de ELISA. Asimismo, cada propagación se evaluó mediante el microscopio invertido y la técnica de Dot blot.

6.4.2. Titulación viral mediante la prueba de focos

Los stocks de ambos *Flavivirus* se titularon por la prueba de focos para determinar la presencia de virus infecciosos. El protocolo de la prueba de focos se basó en el método reportado por Kang y Shin (2012). La formación de focos para ambos *Flavivirus* se puede observar en la figura 45.



Figura 46. Prueba de focos para determinación del título de virus dengue del serotipo 2 o virus Zika. (A) Células VERO E6 sin infectar, a 100X y 48 horas después de alcanzar la confluencia. (B) Células VERO E6 infectadas con DenV-2, a 100X y 48 horas post infección. (C) Células VERO E6 infectadas con ZikV, a 100X y 48 horas post infección. Las flechas rojas señalan focos correspondientes a puntos de propagación de ambos *Flavivirus*.

En la figura 46, se puede observar la presencia de focos para los cultivos de células VERO E6 infectados con los *Flavivirus*. Después de contar todos los focos en las diluciones virales mayores de 10^{-4} y 10^{-5} , se calculó el título viral empleando la ecuación 6, y los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Títulos de los stocks de virus dengue del serotipo 2 y virus Zika.

<i>Flavivirus</i>	Título (UFF/mL)
DenV-2	1×10^4
ZikV	1×10^4 - 1×10^6

Los títulos obtenidos para DenV-2 fueron de 1×10^4 UFF/mL, mientras que, para ZikV, se obtuvieron stocks con títulos de 1×10^4 , 1×10^5 y 1×10^6 UFF/mL. La diferencia en títulos virales entre DenV-2 y ZikV podría deberse a las cepas empleadas, a que el segundo virus tiene mayor facilidad de replicación en el stock de células C6/36 empleadas en este trabajo, a que el primero requiere de SFB para incrementar su título, o a otros factores (Gutiérrez-Barbosa *et al.*, 2020).

6.4.3. Inactivación de DenV-2 y ZikV mediante luz ultravioleta

La inactivación de los stocks de *Flavivirus* se evaluó mediante la prueba de focos. Los títulos obtenidos fueron de cero después de la inactivación. La luz UV es uno de los métodos físicos ampliamente usados para inactivar virus a través de la inducción de mutaciones en el genoma como la formación de los dímeros de timina (Tseng y Li, 2007).

6.5. Inmunización y evaluación de la respuesta inmune humoral

Se esperaría que una vacuna basada en un mimótopo del epítipo EDE pueda conferir protección contra DenV y ZikV sin causar el efecto ADE. No obstante, al ser un péptido pequeño, sería poco inmunogénico (Böttger *et al.*, 2017). Sin embargo, si los péptidos son desplegados en la superficie de PPV, adquieren estabilidad conformacional e incrementan su inmunogenicidad mediante la producción de títulos altos de anticuerpos (O'Rourke *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014).

La evaluación de los sueros preinmunes indicó que los ratones no presentaban anticuerpos anti-DenV-2 o anti-ZikV antes de la inmunización. Los valores de

absorbancia de los sueros preinmunes se muestran en las figuras A11 y A12 del anexo 8. La prueba de Kolmogórov-Smirnov mostró que no todos los grupos presentan una distribución normal de los títulos de anticuerpo IgG; debido a esto, la comparación entre grupos se realizó mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney (McKnight y Najab, 2010).

6.5.1. Primer diseño experimental

Para determinar que las cápsides nativas de VAA-8 no induzcan anticuerpos con reactividad cruzada hacia DenV-2 y ZikV, y que la respuesta de anticuerpos contra ambos virus se deba al despliegue del mimótopo del epítipo EDE1 en las cápsides modificadas de VAA-8, se planteó inmunizar un grupo de ratones con las cápsides nativas. Ya que el grupo 1 fue inmunizado con cápsides modificadas de VAA-8 con bajo grado de pureza (Figura 37), el grupo control asignado para evaluar la respuesta a cápsides nativas recibió clarificado de células Sf9 infectadas con el bacRep Cap 2/8; esto para descartar la inducción de anticuerpos que reconozcan a DenV-2 y/o ZikV por parte de las cápsides nativas de VAA-8 y por parte de los elementos del SCI-BV.

Para la detección de anticuerpos IgG anti-DenV-2 y anti-ZikV, las gráficas de absorbancia versus sus respectivas diluciones de suero se muestran en la figura 47.

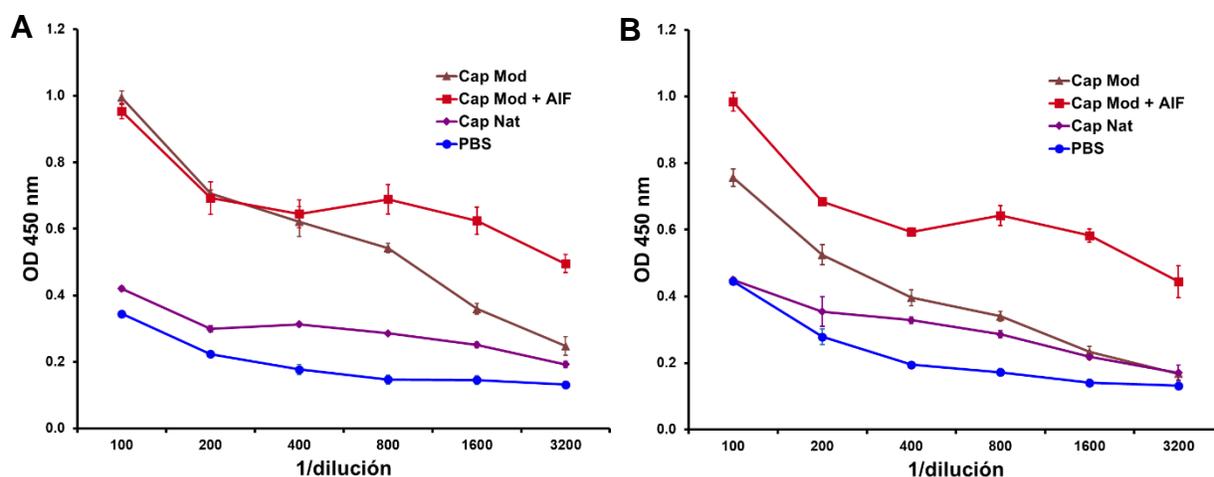


Figura 47. OD a 450 nm de las diluciones seriadas de sueros colectados a los 65 días post inmunización del primer diseño experimental. (A) Valores de absorbancia de la prueba de ELISA para detectar anticuerpos IgG anti-DenV-2. (B) Valores de absorbancia de la prueba de ELISA para detectar anticuerpos IgG anti-ZikV. Las curvas representan el promedio de los valores de absorbancia para cada grupo (n = 5) y las barras de error representan la desviación estándar para los valores de absorbancia. Cap Mod: cápsides modificadas de VAA-8. Cap Nat: cápsides nativas de VAA-8. PBS: solo PBS. AIF: adyuvante incompleto de Freund.

En la figura 47, se observa mayor respuesta de anticuerpos anti-DenV-2 y anti-ZikV en el grupo inmunizado con las cápsides modificadas más AIF. Le sigue el grupo inmunizado solo con las cápsides modificadas, y luego los grupos control. Los títulos de anticuerpos IgG contra ambos *Flavivirus* para cada grupo se muestran en las tablas 9 y 10.

Tabla 9. Títulos de anticuerpos IgG anti-virus dengue del serotipo 2 de sueros colectados a los 65 días post inmunización del primer diseño experimental.

Grupo	Inmunógeno + adyuvante	Media geométrica	IC 95%
1	Cap Mod	1600	[1600-1600]
2	Cap Mod + AIF	1838	[716-4718]
3	Cap Nat	303.1	[113.6-808.6]
4	PBS	114.9	[78.18-168.8]

Tabla 10. Títulos de anticuerpos IgG anti-virus Zika de sueros colectados a los 65 días post inmunización del primer diseño experimental.

Grupo	Inmunógeno + adyuvante	Media geométrica	IC 95%
1	Cap Mod	800	[800-800]
2	Cap Mod + AIF	2425	[1123-5236]
3	Cap Nat	348.2	[237-511.7]
4	PBS	174.1	[84.75-357.7]

Al comparar las medias geométricas entre grupos, se observa que el grupo 2 (Cap Mod + AIF) tiene mayor título (1838 para DenV-2 y 2425 para ZikV), luego le sigue el grupo 1 (Cap Mod), y finalmente, los grupos 3 (Cap Nat) y 4 (PBS) con los títulos más bajos. En el caso de anticuerpos IgG anti-DenV-2, el grupo que recibió cápsides

modificadas más adyuvante tuvo un título similar al grupo que se inmunizó solo con cápsides modificadas; mientras que en el caso de anticuerpos anti-ZikV, el grupo con adyuvante presentó un título 3 veces mayor que el grupo sin adyuvante. La comparación entre los títulos de los grupos se muestra mediante los gráficos de títulos para cada individuo en la figura 48.

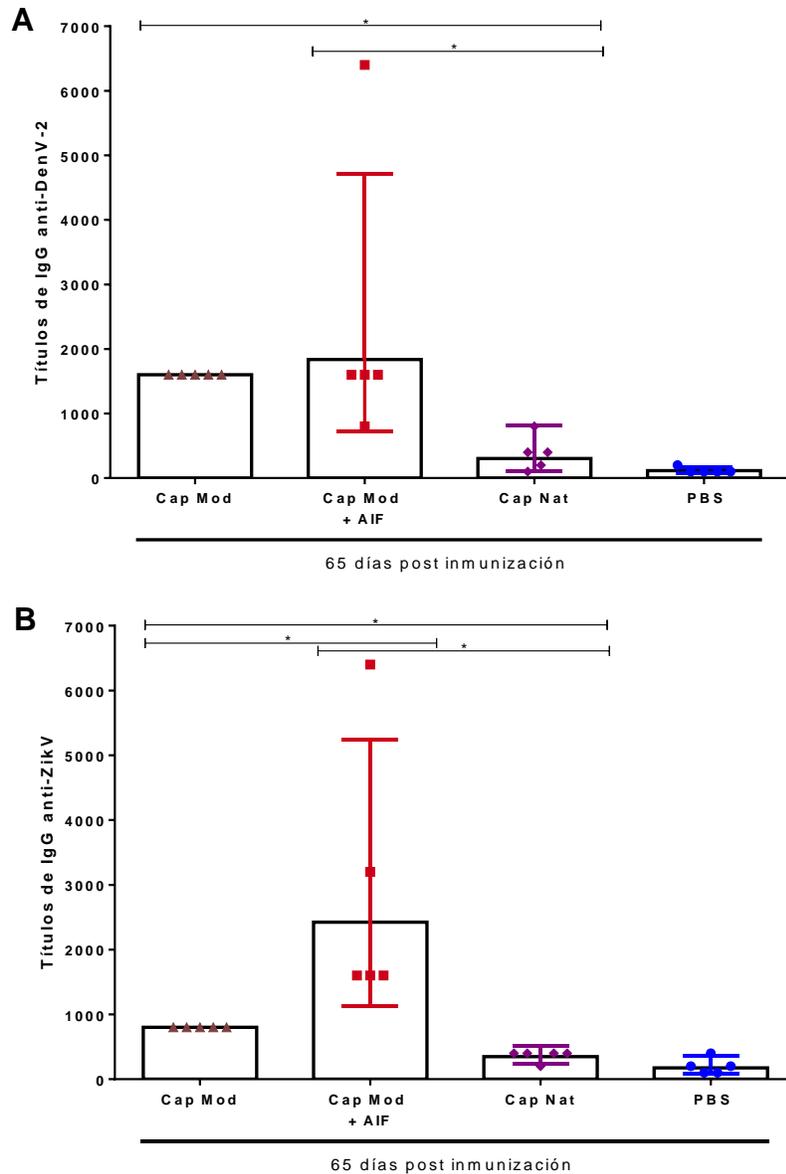


Figura 48. Títulos de anticuerpos IgG de sueros colectados a los 65 días post inmunización del primer diseño experimental. (A) Títulos de anticuerpos IgG anti-DenV-2. (B) Títulos de anticuerpos IgG anti-ZikV. Los títulos calculados mediante el método a punto final se muestran por individuo y con la media geométrica para cada grupo ($n = 5$). Las barras de error representan los intervalos de confianza del 95% para cada grupo. Las diferencias estadísticas significativas ($*p < 0.05$) entre grupos

se determinaron mediante la prueba U de Mann-Whitney. Cap Mod: cápsides modificadas de VAA-8. Cap Nat: cápsides nativas de VAA-8. PBS: solo PBS. AIF: adyuvante incompleto de Freund.

De la figura 48, se observa que todos los grupos presentan una respuesta inmune humoral de anticuerpos IgG homogénea, mientras que en el grupo 2 hay individuos que no siguen la tendencia de la mayoría de dicho grupo. El título de anticuerpos IgG anti-DenV-2 del grupo 2 más bajo fue 800, y el más alto fue 6400; y para el mismo grupo, el título de anticuerpos IgG anti-ZikV más bajo fue 1600 y el más alto fue 6400. Las diferencias entre los títulos de anticuerpos IgG anti-DenV-2 de los grupos 1 y 2 con respecto al grupo 3 son estadísticamente significativas (p-valor = 0.0079 y p-valor = 0.0159, respectivamente), y de igual manera para los títulos anti-ZikV de los grupos 1 y 2 con respecto al grupo 3 (p-valor = 0.0079 y p-valor = 0.0079, respectivamente). Por otro lado, no hay diferencias significativas entre los títulos de anticuerpos IgG anti-DenV-2 de los grupos 1 y 2 (p-valor > 0.9999). En contraste, la diferencia de títulos de anticuerpos IgG anti-ZikV de los grupos 1 y 2 es estadísticamente significativa (p-valor = 0.0079).

Aunque el grupo 1 recibió el adyuvante alúmina en la tercera dosis, no se observó un cambio significativo en la respuesta inmune, en comparación a la respuesta inducida en el grupo 2. Mientras que el AIF principalmente favorece la exposición al antígeno por un periodo prolongado; la alúmina precipita al antígeno y facilita su ingreso a células presentadoras de antígenos (Awate *et al.*, 2013; Arias *et al.*, 2007).

Estos resultados muestran que la inmunización con cápsides modificadas de VAA-8 que despliegan el mimótopo del epítipo EDE1 induce anticuerpos específicos de DenV-2 y ZikV, y que el uso de AIF incrementa considerablemente la respuesta contra ZikV.

6.5.2. Segundo diseño experimental

Para la detección de anticuerpos IgG anti-DenV-2 y anti-ZikV, las gráficas de valores de absorbancia versus sus respectivas diluciones de suero se muestran en la figura 49.

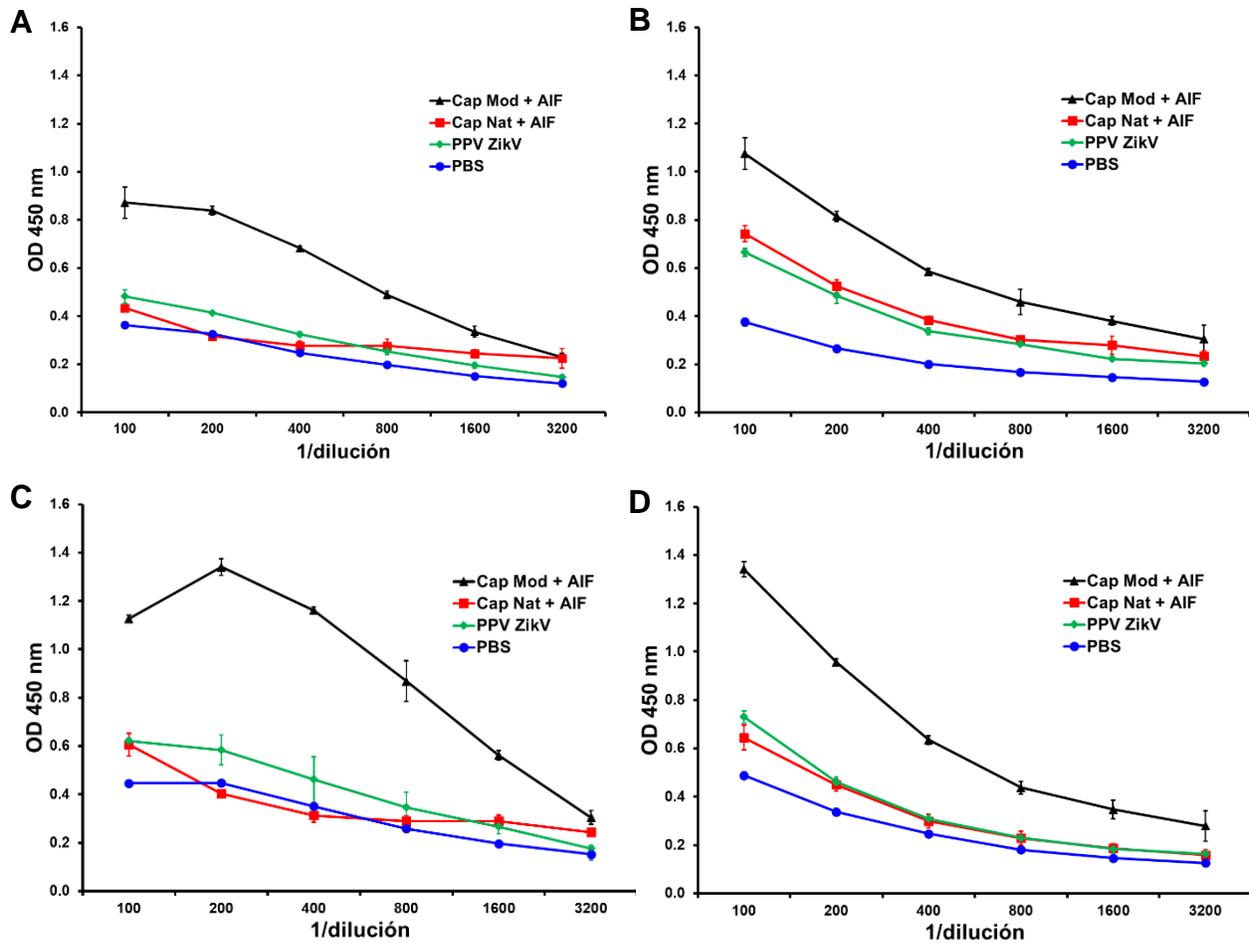


Figura 49. OD a 450 nm de las diluciones seriadas de sueros colectados a los 23 y 116 días post inmunización del segundo diseño experimental. (A) y (B) Valores de absorbancia de la prueba de ELISA para detectar anticuerpos IgG anti-DenV-2 a los 23 y 116 dpi, respectivamente. (C) y (D) Valores de absorbancia de la prueba de ELISA para detectar anticuerpos IgG anti-ZikV a los 23 y 116 dpi, respectivamente. Las curvas representan el promedio de los valores de absorbancia para cada grupo (n = 5 para todos los grupos; excepto para el grupo 1 y grupo 4 a los 116 dpi, un individuo de cada uno de esos grupos murió antes de los 116 dpi, n = 4) y las barras de error representan la desviación estándar para los valores de absorbancia. Cap Mod: cápsides modificadas de VAA-8. Cap Nat: cápsides nativas de VAA-8. PPV ZikV: partículas pseudovirales de ZikV. PBS: solo PBS. AIF: adyuvante incompleto de Freund.

En la figura 49, a los 23 dpi se observa mayor respuesta de anticuerpos anti-DenV-2 y anti-ZikV en el grupo inmunizado con las cápsides modificadas más AIF en comparación a los otros grupos. De igual manera, a los 116 dpi, el mismo grupo presenta mayor respuesta de anticuerpos contra ambos *Flavivirus*. Al comparar las curvas de los sueros colectados en los dos tiempos, aparentemente se observa un

ligero incremento en las curvas de todos los grupos, excepto en las curvas del grupo control que recibió solo PBS.

Para comparar las respuestas entre los grupos y entre los tiempos, se calculó el título de anticuerpos IgG contra ambos *Flavivirus*. Los resultados se muestran en las tablas 11, 12, 13 y 14.

Tabla 11. Títulos de anticuerpos IgG anti-virus dengue del serotipo 2 de sueros colectados a los 23 días post inmunización del segundo diseño experimental.

Grupo	Inmunógeno + adyuvante	Media geométrica	IC 95%
1	Cap Mod + AIF	919	[625.4-1350]
2	Cap Nat + AIF	132	[82.36-211.4]
3	PPV ZikV	459.5	[223.7-943.9]
4	PBS	303.1	[189.2-485.7]

Tabla 12. Títulos de anticuerpos IgG anti-virus dengue del serotipo 2 de sueros colectados a los 116 días post inmunización del segundo diseño experimental.

Grupo	Inmunógeno + adyuvante	Media geométrica	IC 95%
1	Cap Mod + AIF	672.7	[128.7-3518]
2	Cap Nat + AIF	151.6	[94.61-242.8]
3	PPV ZikV	303.1	[140.4-654.5]
4	PBS	200	[55.98-714.6]

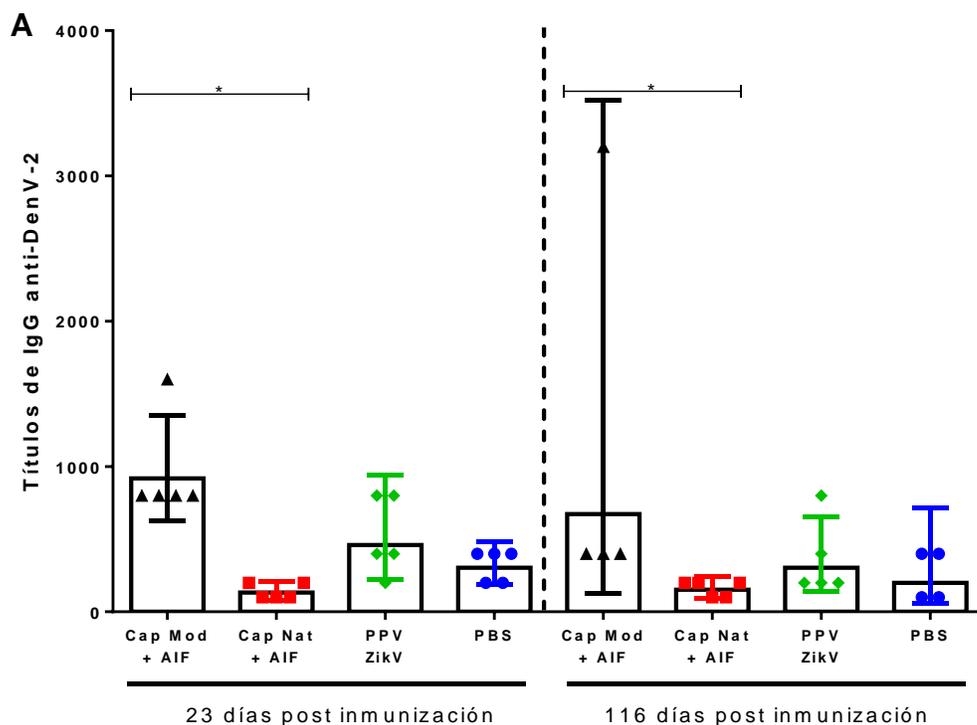
Tabla 13. Títulos de anticuerpos IgG anti-virus Zika de sueros colectados a los 23 días post inmunización del segundo diseño experimental.

Grupo	Inmunógeno + adyuvante	Media geométrica	IC 95%
1	Cap Mod + AIF	2111	[1318-3382]
2	Cap Nat + AIF	229.7	[156.4-337.6]
3	PPV ZikV	696.4	[339.0-1431]
4	PBS	-	-

Tabla 14. Títulos de anticuerpos IgG anti-virus Zika de sueros colectados a los 116 días post inmunización del segundo diseño experimental.

Grupo	Inmunógeno + adyuvante	Media geométrica	IC 95%
1	Cap Mod + AIF	1131	[375.5-3408]
2	Cap Nat + AIF	200	[200-200]
3	PPV ZikV	400	[217.7-735.1]
4	PBS	237.8	[82.74-683.7]

Para los anticuerpos IgG anti-DenV-2 y anti-ZikV, al comparar la media geométrica de los títulos, se observa que el grupo que fue inmunizado con cápsides modificadas de VAA-8 presenta mayor título de anticuerpos para ambos tiempos (23 dpi y 116 dpi), en comparación con los otros grupos. Por otro lado, a los 23 dpi el título de anticuerpos IgG anti-DenV-2 del grupo 1 fue 1.36 veces mayor en comparación a los 116 dpi; y para los anticuerpos IgG anti-ZikV del grupo 1, a los 23 dpi el título fue 1.86 veces mayor que a los 116 dpi. En el grupo control inmunizado con PPV de ZikV, se obtienen títulos de anticuerpos menores en comparación al grupo 1 debido a que no se empleó AIF. Una comparación entre los títulos de los grupos y los individuos de cada grupo se muestra mediante gráficos en la figura 50.



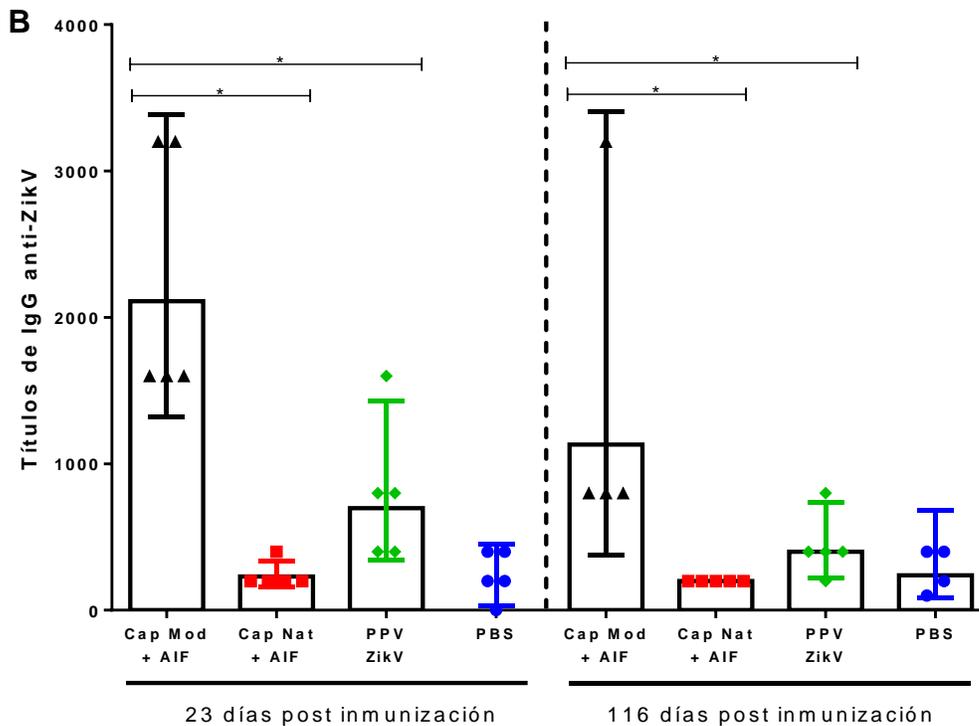


Figura 50. Títulos de anticuerpos IgG de sueros colectados a los 23 y 116 días post inmunización del segundo diseño experimental. (A) Títulos de anticuerpos IgG anti-DenV-2. (B) Títulos de anticuerpos IgG anti-ZikV. Los títulos calculados mediante el método a punto final se muestran por individuo y con la media geométrica para cada grupo (n = 5 para todos los grupos; excepto para el grupo 1 y grupo 4 a los 116 dpi, un individuo de cada uno de esos grupos murió antes de los 116 dpi, n = 4). Las barras de error representan los intervalos de confianza del 95% para cada grupo. Las diferencias estadísticas significativas (* $p < 0.05$) entre grupos se determinaron mediante la prueba U de Mann-Whitney. Cap Mod: cápsides modificadas de VAA-8. Cap Nat: cápsides nativas de VAA-8. PPV ZikV: partículas pseudovirales de ZikV. PBS: solo PBS. AIF: adyuvante incompleto de Freund.

En los dos tiempos de evaluación, algunos individuos del grupo 1 presentaron mayor respuesta de anticuerpos IgG contra ambos *Flavivirus* en comparación con la tendencia que siguen los demás individuos de ese mismo grupo (Figura 50). Se observa que todos los individuos del grupo 1, el cual recibió cápsides modificadas de VAA-8 que despliegan al mimótopo del epítipo EDE1, presentan mayor título de anticuerpos que los individuos del grupo 2, el cual recibió las cápsides nativas de VAA-8. Estas diferencias entre ambos grupos son estadísticamente significativas, para los títulos de anticuerpos IgG anti-DenV-2 a los 23 dpi, el p-valor entre el grupo 1 y grupo 2 es de 0.0079, y a los 116 dpi, el p-valor también es de 0.0079; y para los títulos de anticuerpos IgG anti-ZikV a los 23 dpi y 116 dpi, el p-valor también es

de 0.0079. Por otro lado, los individuos del grupo control, al cual se le administraron PPV de ZikV, presentaron títulos de anticuerpos con valores similares a los de los grupos 1 y 2, para ambos *Flavivirus* y en los dos tiempos. De estos resultados, se puede afirmar que la inmunización con cápsidas modificadas de VAA-8 que despliegan el mimótopo del epítipo EDE1 induce anticuerpos específicos de DenV-2 y ZikV, y que efectivamente, como en el primer diseño experimental, las cápsidas nativas no inducen anticuerpos contra ambos *Flavivirus*.

El objetivo principal de las vacunas es generar protección a largo plazo, la cual principalmente depende de la respuesta inmune de memoria y de los anticuerpos circulantes en el individuo inmunizado (Erlich y Congeni, 2012). Particularmente, en algunas infecciones como la causada por *Neisseria meningitidis*, la presencia de anticuerpos circulantes podría ser más importante que la respuesta inmune de memoria, ya que ante una exposición a dicha bacteria y a su periodo de incubación corto de 3 a 4 días y a que la respuesta estimulada de células B de memoria puede tomar hasta 5 días; la respuesta inmune innata y los altos niveles de anticuerpos protectores circulantes serían la primera línea de defensa para evitar que la infección progrese (Erlich y Congeni, 2012). De igual manera, los anticuerpos circulantes cumplirían un rol importante para evitar el progreso de infecciones por DenV y/o ZikV, ya que los periodos de incubación de estos patógenos también pueden ser cortos (3 días) (Chan y Johansson, 2012; Krow-Lucal *et al.*, 2017). Por lo tanto, en este segundo diseño experimental se evaluaron sueros a los 116 dpi para determinar la persistencia de anticuerpos circulantes contra ambos *Flavivirus*. El análisis estadístico mostró que no hay diferencias significativas entre los títulos de anticuerpo del grupo 1 a los 23 dpi y a los 116 dpi (p-valor = 0.2698 para anticuerpos anti-DenV-2 y p-valor = 0.2381 para anticuerpos anti-ZikV), aunque la tendencia de los títulos por individuo mostró que la respuesta a los 116 dpi disminuyó en comparación a los 23 dpi.

Ya que el candidato vacunal está basado en el mimótopo del epítipo EDE1 compartido entre ambos *Flavivirus*, el cual es reconocido por el AcM EDE1-C8, los títulos de anticuerpo IgG totales en los ratones inmunizados serían equivalentes a este AcM. Baba-Spaeth *et al.* (2016) reportan valores de concentración inhibitoria

media (IC50 o 50% FRNT) del AcM EDE1-C8 de entre 0.015 a 1.13 nM para DenV y ZikV; sin embargo, no hay reportes de correlatos de protección para ambos *Flavivirus* basados en el título de anticuerpos EDE1-C8, y por esto, no se sabe si la respuesta de anticuerpos anti-DenV-2 y anti-ZikV inducida por la inmunización con el mimótopo desplegado en las cápsides, en el presente trabajo, es suficiente para proteger a los individuos frente a una infección.

Los estudios que reportan el despliegue de péptidos inmunogénicos en la cápside de VAA muestran la inducción de anticuerpos IgG totales específicos del péptido desplegado, y también muestran la generación de anticuerpos neutralizante; y estas respuestas pueden aumentar con el incremento de la cantidad de proteína administrada, el uso de adyuvante y el número de dosis (Nieto *et al.*, 2012, Singer *et al.*, 2016); pero en algunos casos el aumento del número de dosis no resulta en un incremento de la respuesta (Nieto *et al.*, 2012). Por ejemplo, Nieto *et al.* (2012) reportan que, al aumentar de dosis de 0.6 µg a 30 µg e incluir adyuvante, los títulos de anticuerpos IgG totales aumentan más de 10 veces. Estos estudios de referencia indica que existe la posibilidad de que las respuestas inmunes humorales obtenidas también incluyan la inducción de anticuerpos neutralizantes de DenV-2 y ZikV.

Resulta compleja la comparación entre las respuestas obtenidas en los dos diseños experimentales, ya que son distintos en varios aspectos. A diferencia del primer diseño experimental, en el segundo diseño las cápsides nativas y modificadas de VAA-8 para inmunizar a los grupos de ratones, se obtuvieron por el mismo proceso de purificación. Las dosis administradas de proteína total que contenían a las cápsides de VAA-8 fueron entre 5 a 10 veces (100 µg por ratón) las dosis del primer diseño experimental. Al grupo que recibió cápsides nativas también se le incluyó AIF en la formulación; la administración fue por vía intramuscular, y se inmunizaron ratones de mayor edad (13 - 14 semanas). Es importante mencionar que, a medida que los ratones presentan mayor edad, la respuesta inmune frente a un antígeno o vacuna se puede ver afectada (Baldwin *et al.*, 2018); y con respecto a esto, en el segundo diseño experimental se observó que, a pesar de la edad, las cápsides modificadas inducen la producción de anticuerpos contra ambos *Flavivirus*.

Mientras que en el primer diseño experimental se evaluaron sueros colectados 12 días después de la cuarta dosis, en el segundo diseño se evaluaron sueros colectados 8 días después de la segunda dosis y ~ 10 semanas después de la cuarta dosis (71 días). En general, en ambos diseños experimentales se observa una mayor respuesta de títulos de anticuerpos contra ambos *Flavivirus* en los grupos inmunizados con las cápsides modificadas de VAA-8 que despliegan al mimótopo del epítipo EDE1, en comparación con los otros grupos.

7. CONCLUSIONES

En el presente estudio se desarrolló un nuevo candidato a vacuna dual contra DenV y ZikV. El candidato se basa en la secuencia “HSPLEKPVPHRS” insertada y desplegada en la superficie de la cápside de VAA-8 (cápsides modificadas). Esta secuencia representa un mimótopo del epítipo conformacional EDE1, presente en los cuatro serotipos de DenV y en el único serotipo de ZikV.

En primer lugar, se generó el plásmido pSR660M1, el cual constituye una plataforma para la inserción de secuencias heterólogas dentro del gen *cap* de VAA-8 utilizando métodos sencillos de biología molecular. Posteriormente, empleando el vector pSR660M1, se generó el baculovirus recombinante bacCapMod para la producción del candidato vacunal en el SCI-BV. Se evaluaron diferentes variantes de las proporciones de iodixanol propuestas por Zolotukhin *et al.* (1999) para purificar a las cápsides modificadas de VAA-8, y se determinó que la variante “Nueva 2” resultó adecuada para la purificación de estas cápsides. Se demostró que el anticuerpo monoclonal EDE1-C8 reconoce al mimótopo del epítipo EDE1 que se encuentra desplegado en la superficie de VAA-8. La formación y la estructura de cápsides se verificó a través de microscopía electrónica de transmisión y criomicroscopía electrónica. Este resultado es el primer reporte de la formación de cápsides de VAA-8 con una inserción de 24 aa en el bucle (*loop*) IV de sus VPs. Sin embargo, la inserción de los 24 aa está relacionada con mayor actividad proteolítica sobre las VPs y la formación de ensamblados proteicos de tamaño diferente al esperado.

Finalmente, se evaluaron dos diseños experimentales de inmunización de ratones BALB/c con el candidato vacunal y en ambos se generaron anticuerpos IgG que reconocen a DenV-2 y a ZikV con títulos, determinados por el método a punto final, de hasta 1838 y 2425, respectivamente. Estos anticuerpos se detectaron incluso a los 116 días post inmunización.

8. PERSPECTIVAS

Con el fin de mejorar el sistema de producción y purificación, se sugiere evaluar el uso de inhibidores de proteasa para reducir la proteólisis de las proteínas VPs modificadas de VAA-8 o realizar la inserción y despliegue del mimótopo en la cápside de VAA-2, el cual se reporta como un serotipo que tolera muy bien la inserción de péptidos.

Para caracterizar más el despliegue del mimótopo en las cápsides modificadas y determinar la composición de los ensamblados, se podría aplicar la técnica *immunogolding* y realizar un análisis más exhaustivo a través de criomicroscopía electrónica de transmisión.

Con respecto a la respuesta inmune, se sugiere Inmunizar ratones con cápsides modificadas de VAA-8 que presenten alto grado de pureza (>95%), y de esa manera, determinar si la respuesta inmune humoral obtenida en el presente estudio estaría siendo modulada por la presencia de impurezas en la formulación del candidato vacunal.

También es importante medir el título de anticuerpos IgG anti-DenV-2 y anti-ZikV en sueros colectados en diferentes días post inmunización a los evaluados en el presente trabajo. Además, se requiere determinar si el candidato vacunal también induce respuesta inmune humoral contra los otros serotipos de DenV.

Asimismo, como parte de la caracterización de la respuesta inmune inducida en ratones inoculados con el candidato vacunal, resulta importante determinar la producción de anticuerpos neutralizantes, respuesta inmune celular y protección frente al reto con DenV y/o ZikV.

9. REFERENCIAS

- Arias, J. D. C., Sánchez, D. C., Vásquez, M. C., Fernández, C. M., & Parra, L. M. (2007). Evaluación de dos adyuvantes en la formulación de una vacuna antitetánica. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 10(1), 129-138.
- Ávila-Pérez, G., Nogales, A., Martín, V., Almazán, F., & Martínez-Sobrido, L. (2018). Reverse Genetic Approaches for the Generation of Recombinant Zika Virus. *Viruses*, 10(11), 597.
- Awate, S., Babiuk, L. A. B., & Mutwiri, G. (2013). Mechanisms of action of adjuvants. *Frontiers in immunology*, 4, 114.
- Baldwin, S. L., Hsu, F. C., Van Hoeven, N., Gage, E., Granger, B., Guderian, J. A., Larsen, S. E., Lorenzo, E. C., Haynes, L., Reed, S. G., & Coler, R. N. (2018). Improved Immune Responses in Young and Aged Mice with Adjuvanted Vaccines against H1N1 Influenza Infection. *Frontiers in immunology*, 9, 295.
- Barba-Spaeth, G., Dejnirattisai, W., Rouvinski, A., Vaney, M.-C., Medits, I., Sharma, A., Simon-Lorière, E., Sakuntabhai, A., Cao-Lormeau, V.-M., Haouz, A., England, P., Stiasny, K., Mongkolsapaya, J., Heinz, F. X., Screaton, G. R., & Rey, F. A. (2016). Structural basis of potent Zika–dengue virus antibody cross-neutralization. *Nature*, 536(7614), 48-53.
- Bardina, S. V., Bunduc, P., Tripathi, S., Duehr, J., Frere, J. J., Brown, J. A., Nachbagauer, R., Foster, G. A., Kryzstof, D., Tortorella, D., Stramer, S. L., García-Sastre, A., Krammer, F., & Lim, J. K. (2017). Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting antinflavivirus immunity. *Science*, 356(6334), 175-180.
- Bastola, P., Song, L., Gilger, B. C., & Hirsch, M. L. (2020). Adeno-Associated Virus Mediated Gene Therapy for Corneal Diseases. *Pharmaceutics*, 12(8), 767.
- Betancourt, Y. P. (2010). Papel del sistema inmune en la patogenia de la infección por el virus del dengue. *Alergia, Asma e Inmunología pediátricas*, 19(1), 23-29.
- Bleckmann, M., Schürig, M., Chen, F.-F., Yen, Z.-Z., Lindemann, N., Meyer, S., Spehr, J., & van den Heuvel, J. (2016). Identification of essential genetic baculoviral elements for recombinant protein expression by transactivation in Sf21 insect cells. *PLoS One*, 11(3), e0149424.
- Börner, K., Kienle, E., Huang, L.-Y., Weinmann, J., Sacher, A., Bayer, P., Stüllein, C., Fakhiri, J., Zimmermann, L., Westhaus, A., Beneke, J., Beil, N., Wiedtke, E., Schmelas, C., Miltner, D., Rau, A., Erfle, H., Kräusslich, H.-G., Müller, M., Agbandje-McKenna, M., & Grimm, D. (2020). Pre-arrayed pan-AAV peptide display libraries for rapid single-round screening. *Molecular Therapy*, 28(4), 1016–1032.

- Böttger, R., Hoffmann, R., & Knappe, D. (2017). Differential stability of therapeutic peptides with different proteolytic cleavage sites in blood, plasma and serum. *PLoS one*, 12(6), e0178943.
- Buclez, P. O., Florencio, G. D., Relizani, K., Beley, C., Garcia, L., & Benchaouir, R. (2016). Rapid, scalable, and low-cost purification of recombinant adeno-associated virus produced by baculovirus expression vector system. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 3, 16035.
- Buhrman, J. D., & Slansky, J. E. (2013). Improving T cell responses to modified peptides in tumor vaccines. *Immunologic research*, 55(1-3), 34-47.
- Büning, H., & Srivastava, A. (2019). Capsid modifications for targeting and improving the efficacy of AAV vectors. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 12, 248-265.
- Burrell, C. J., Howard, C. R., Murphy, F. E., Burrell, C. J., Howard, C. R., & Murphy, F. A. (2017). Vaccines and Vaccination. *Fenner and White's Medical Virology*, 155-167.
- Buxbaum, L. U., & Scott, P. (2005). Interleukin 10-and Fcγ receptor-deficient mice resolve *Leishmania mexicana* lesions. *Infection and immunity*, 73(4), 2101-2108.
- Calina, D., Docea, A., Petrakis, D., Egorov, A., Ishmukhametov, A., Gabibov, A., Shtilman, M., Kostoff, R., Carvalho, F., Vinceti, M., Spandidos, D., & Tsatsakis, A. (2020). Towards effective COVID-19 vaccines: Updates, perspectives and challenges. *International Journal of Molecular Medicine*, 46(1), 3-16.
- Callaway, E. (2020). The race for coronavirus vaccines: a graphical guide. *Nature*, 580(7805), 576.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2019. World Map of Areas with Risk of Zika. Disponible en: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/page/zika-travel-information> (Consultado el 26 de julio del 2020)
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2020. Dengue Map. Disponible en: <https://www.healthmap.org/dengue/en/> y <https://www.cdc.gov/dengue/areaswithrisk/around-the-world.html> (Consultado el 26 de julio del 2020)
- Centro Nacional de Defectos Congénitos y Discapacidades del Desarrollo (NCBDDD)-Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), 2016. Datos sobre la microcefalia. Disponible en: <https://www.cdc.gov/ncbddd/spanish/birthdefects/microcephaly.html> (Consultado el 24 de noviembre del 2019)
- Chahal, P. S., Aucoin, M. G., & Kamen, A. (2007). Primary recovery and chromatographic purification of adeno-associated virus type 2 produced by baculovirus/insect cell system. *Journal of virological methods*, 139(1), 61-70.

- Chan, M., & Johansson, M. A. (2012). The incubation periods of dengue viruses. *PloS one*, 7(11), e50972.
- Chart, H., Evans, J., Chalmers, R. M., & Salmon, R. L. (1998). *Escherichia coli* O157 serology: false-positive ELISA results caused by human antibodies binding to bovine serum albumin. *Letters in applied microbiology*, 27(2), 76-78.
- Chávez Peña, C. (2011). Desarrollo de un sistema de entrega de sustancias para células utilizando partículas pseudovirales de virus adeno-asociado. Tesis de maestría en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Chen, L. H., & Wilson, M. E. (2016). Update on non-vector transmission of dengue: relevant studies with Zika and other flaviviruses. *Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines*, 2(1), 1-6.
- Chen, Y. C., Cheng, H. F., Yang, Y. C., & Yeh, M. K. (2017). Biotechnologies applied in biomedical vaccines. *Vaccine*. Rijeka: Intech Open, 97-110.
- Colt, S., Garcia-Casal, M. N., Peña-Rosas, J. P., Finkelstein, J. L., Rayco-Solon, P., Prinzo, Z. C. W., & Mehta, S. (2017). Transmission of Zika virus through breast milk and other breastfeeding-related bodily-fluids: A systematic review. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(4), e0005528.
- Corneillie, L., Banda, D. H., & Meuleman, P. (2019). Animal Models for Hepatitis E Virus. *Viruses*, 11(6), 564.
- Crawford, F., Huseby, E., White, J., Marrack, P., & Kappler, J. W. (2004). Mimotopes for alloreactive and conventional T cells in a peptide-MHC display library. *PLoS Biology*, 2(4), e90.
- Dai, L., Wang, Q., Qi, J., Shi, Y., Yan, J., & Gao, G. F. (2016). Molecular basis of antibody-mediated neutralization and protection against flavivirus. *IUBMB life*, 68(10), 783-791.
- Dejnirattisai, W., Wongwiwat, W., Supasa, S., Zhang, X., Dai, X., Rouvinski, A., Jumnainsong, A., Edwards, C., Quyen, N. T. H., Duangchinda, T., Grimes, J. M., Tsai, W.-Y., Lai, C.-Y., Wang, W.-K., Malasit, P., Farrar, J., Simmons, C. P., Zhou, Z. H., Rey, F. A., Mongkolsapaya, J. & Screaton, G. R. (2015). A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus. *Nature immunology*, 16(2), 170-177.
- Delrue, I., Verzele, D., Madder, A., & Nauwynck, H. J. (2012). Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges. *Expert review of vaccines*, 11(6), 695-719.
- Dénes, A., Ibrahim, M. A., Oluoch, L., Tekeli, M., & Tekeli, T. (2019). Impact of weather seasonality and sexual transmission on the spread of Zika fever. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.

- Dey, A. K., Malyala, P., & Singh, M. (2014). Physicochemical and functional characterization of vaccine antigens and adjuvants. *Expert review of vaccines*, 13(5), 671-685.
- Diamond, M. S., Ledgerwood, J. E., & Pierson, T. C. (2019). Zika virus vaccine development: Progress in the face of new challenges. *Annual review of medicine*, 70, 121-135.
- Donnelly, R. F. (2017). Vaccine delivery systems. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 13(1), 17.
- Elong Ngonu, A., & Shresta, S. (2018). Immune response to dengue and Zika. *Annual review of immunology*, 36, 279-308.
- Erlich, K. S., & Congeni, B. L. (2012). Importance of circulating antibodies in protection against meningococcal disease. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 8(8), 1029-1035.
- Fernandez, E., & Diamond, M. S. (2017). Vaccination strategies against Zika virus. *Current opinion in virology*, 23, 59-67.
- Fernandez, E., Dejnirattisai, W., Cao, B., Scheaffer, S. M., Supasa, P., Wongwiwat, W., Esakky, P., Drury, A., Mongkolsapaya, J., Moley, K. H., Mysorekar, I. U., Screaton, G. R., & Diamond, M. S. (2017). Anti-Dengue E-dimer epitope human antibodies have therapeutic activity against Zika virus infection. *Nature immunology*, 18(11), 1261.
- Fibriansah, G., & Lok, S. M. (2016). The development of therapeutic antibodies against dengue virus. *Antiviral research*, 128, 7-19.
- Fishman, J. M., Wiles, K., & Wood, K. J. (2015). The acquired immune system response to biomaterials, including both naturally occurring and synthetic biomaterials. In *Host Response to Biomaterials* (pp. 151-187). Academic Press.
- Frey, A., Di Canzio, J., & Zurakowski, D. (1998). A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *Journal of immunological methods*, 221(1-2), 35-41.
- Gagic, D., Ciric, M., Wen, W. X., Ng, F., & Rakonjac, J. (2016). Exploring the secretomes of microbes and microbial communities using filamentous phage display. *Frontiers in microbiology*, 7, 429.
- Gaj, T., Epstein, B. E., & Schaffer, D. V. (2016). Genome engineering using adeno-associated virus: basic and clinical research applications. *Molecular Therapy*, 24(3), 458-464.
- Galibert, L., Savy, A., Dickx, Y., Bonnin, D., Bertin, B., Mushimiyimana, I., van Oers, M. M., & Merten, O.-W. (2018). Origins of truncated supplementary capsid proteins in rAAV8 vectors produced with the baculovirus system. *PloS one*, 13(11), e0207414.

- Gallo-Ramírez, L. E., Ramírez, O. T., & Palomares, L. A. (2011). Intracellular localization of adeno-associated viral proteins expressed in insect cells. *Biotechnology progress*, 27(2), 483-493.
- Garg, H., Mehmetoglu-Gurbuz, T., & Joshi, A. (2018). Recent advances in Zika virus vaccines. *Viruses*, 10(11), 631.
- Gimenez, H. B., Keir, H. M., & Cash, P. (1989). In vitro enhancement of respiratory syncytial virus infection of U937 cells by human sera. *Journal of general virology*, 70(1), 89-96.
- Gonzalez-Hernandez, M. B., Cunha, J. B., & Wobus, C. E. (2012). Plaque assay for murine norovirus. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (66), e4297.
- Grifoni, A., Pham, J., Sidney, J., O'Rourke, P. H., Paul, S., Peters, B., Martini, S. R., de Silva, A. D., Ricciardi, M. J., Magnani, D. M., Silveira, C. G. T., Maestri, A., Costa, P. R., de-Oliveira-Pinto, L. M., de Azeredo, E. L., Damasco, P. V., Phillips, E., Mallal, S., de Silva, A. M., Collins, M., Durbin, A., Diehl, S. A., Cerpas, C., Balmaseda, A., Kuan, G., Coloma, J., Harris, E., Crowe Jr, J. E., Stone, M., Norris, P. J., Busch, M., Vivanco-Cid, H., Cox, J., Graham, B. S., Ledgerwood, J. E., Turtle, L., Solomon, T., Kallas, E. G., Watkins, D. I., Weiskopf, D., & Sette, A. (2017). Prior Dengue virus exposure shapes T cell immunity to Zika virus in humans. *Journal of virology*, 91(24).
- Gurda, B. L., Raupp, C., Popa-Wagner, R., Naumer, M., Olson, N. H., Ng, R., McKenna, R., Baker, T. S., Kleinschmidt, J. A., & Agbandje-McKenna, M. (2012). Mapping a neutralizing epitope onto the capsid of adeno-associated virus serotype 8. *Journal of virology*, JVI-00218.
- Gutiérrez-Barbosa, H., Castañeda, N. Y., & Castellanos, J. E. (2020). Differential replicative fitness of the four dengue virus serotypes circulating in Colombia in human liver Huh7 cells. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 24(1), 13-24.
- Halstead, S. B. (2014). Pathogenic exploitation of Fc activity. In *Antibody Fc* (pp. 333-350). Academic Press.
- Halstead, S. B., Mahalingam, S., Marovich, M. A., Ubol, S., & Mosser, D. M. (2010). Intrinsic antibody-dependent enhancement of microbial infection in macrophages: disease regulation by immune complexes. *The Lancet infectious diseases*, 10(10), 712-722.
- Heinz, F. X., & Stiasny, K. (2017). The antigenic structure of Zika virus and its relation to other flaviviruses: implications for infection and immunoprophylaxis. *Microbiology and molecular Biology reviews*, 81(1), e00055-16.
- Hessell, A. J., McBurney, S., Pandey, S., Sutton, W., Liu, L., Li, L., Totrov, M., Zolla-Pazner, S., Haigwood, N. L., & Gorny, M. K. (2016). Induction of neutralizing antibodies in rhesus macaques using V3 mimotope peptides. *Vaccine*, 34:2713–21.

- Hom, L. G., & Volkman, L. E. (1998). Preventing proteolytic artifacts in the baculovirus expression system. *BioTechniques*, 25(1), 18-20.
- Horowitz, E. D., Rahman, K. S., Bower, B. D., Dismuke, D. J., Falvo, M. R., Griffith, J. D., Harvey, S. C., & Asokan, A. (2013). Biophysical and ultrastructural characterization of adeno-associated virus capsid uncoating and genome release. *Journal of virology*, 87(6), 2994-3002.
- Houimel & Dellagi. (2009). Peptide mimotopes of rabies virus glycoprotein with immunogenic activity. *Vaccine*, 27:4648-55.
- Invitrogen. (2015). Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System. Disponible en: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/bactobac_man.pdf
- Jagu, S., Karanam, B., Wang, J. W., Zayed, H., Weghofer, M., Brendle, S. A., Balogh, K. K., Tossi, K. P., Roden, R. B. S., & Christensen, N. D. (2015). Durable immunity to oncogenic human papillomaviruses elicited by adjuvanted recombinant Adeno-associated virus-like particle immunogen displaying L2 17–36 epitopes. *Vaccine*, 33(42), 5553-5563.
- Kang, W., & Shin, E. C. (2012). Colorimetric focus-forming assay with automated focus counting by image analysis for quantification of infectious hepatitis C virions. *PLoS One*, 7(8), e43960.
- Katzelnick, L. C., Gresh, L., Halloran, M. E., Mercado, J. C., Kuan, G., Gordon, A., Balmaseda, A., & Harris, E. (2017). Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science*, 358(6365), 929-932.
- Katzelnick, L. C., Narvaez, C., Arguello, S., Lopez Mercado, B., Collado, D., Ampie, O., Elizondo, D., Miranda, T., Bustos Carillo, F., Mercado, J. C., Latta, K., Schiller, A., Segovia-Chumbez, B., Ojeda, S., Sanchez, N., Plazaola, M., Coloma, J., Halloran, M. E., Premkumar, L., Gordon, A., Narvaez, F., de Silva, A. M., Kuan, G., Balmaseda, A., & Harris, E. (2020). Zika virus infection enhances future risk of severe dengue disease. *Science*, 369(6507), 1123-1128.
- Knittelfelder, R., Riemer, A. B., & Jensen-Jarolim, E. (2009). Mimotope vaccination—from allergy to cancer. *Expert opinion on biological therapy*, 9(4), 493-506.
- Koerber, J. T., Jang, J. H., Yu, J. H., Kane, R. S., & Schaffer, D. V. (2007). Engineering adeno-associated virus for one-step purification via immobilized metal affinity chromatography. *Human gene therapy*, 18(4), 367-378.
- Konishi, E., Kitai, Y., Nishimura, K., & Harada, S. (2010). Antibodies to bovine serum albumin in human sera: problems and solutions with casein-based ELISA in the detection of natural Japanese encephalitis virus infections. *Jpn. J. Infect. Dis*, 63(4), 296-298.
- Kostyuchenko, V. A., Lim, E. X. Y., Zhang, S., Fibriansah, G., Ng, T.-S., Ooi, J. S. G., Shi, J., & Lok, S.-M. (2016). Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature*, 533(7603), 425-428.

- Krow-Lucal, E. R., Biggerstaff, B. J., & Staples, J. E. (2017). Estimated incubation period for Zika virus disease. *Emerging infectious diseases*, 23(5), 841.
- Kurian, J. J., Lakshmanan, R., Chmely, W. M., Hull, J. A., Yu, J. C., Bennett, A., McKenna, R., & Agbandje-McKenna, M. (2019). Adeno-Associated Virus VP1u Exhibits Protease Activity. *Viruses*, 11(5), 399.
- Langerak, T., Mumtaz, N., Tolk, V. I., van Gorp, E. C., Martina, B. E., Rockx, B., & Koopmans, M. P. (2019). The possible role of cross-reactive dengue virus antibodies in Zika virus pathogenesis. *PLoS pathogens*, 15(4), e1007640.
- Lessler, J., Chaisson, L. H., Kucirka, L. M., Bi, Q., Grantz, K., Salje, H., Carcelen, A. C., Ott, C. T., Sheffield, J. S., Ferguson, N. M., Cummings, D. A. T., Metcalf, C. J. E., & Rodriguez-Barranquer, I. (2016). Assessing the global threat from Zika virus. *Science*, 353(6300), aaf8160.
- Li, W., Joshi, M. D., Singhania, S., Ramsey, K. H., & Murthy, A. K. (2014). Peptide vaccine: progress and challenges. *Vaccines*, 2(3), 515-536.
- Li, Z., & Blissard, G. W. (2010). Baculovirus GP64 disulfide bonds: the intermolecular disulfide bond of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus GP64 is not essential for membrane fusion and virion budding. *Journal of virology*, 84(17), 8584-8595.
- Lin, H. H., Yip, B. S., Huang, L. M., & Wu, S. C. (2018). Zika virus structural biology and progress in vaccine development. *Biotechnology advances*, 36(1), 47-53.
- Lua, L. H., Connors, N. K., Sainsbury, F., Chuan, Y. P., Wibowo, N., & Middelberg, A. P. (2014). Bioengineering virus-like particles as vaccines. *Biotechnology and bioengineering*, 111(3), 425-440.
- Mak, T., & Saunders, M. (2006). *Vaccines and Clinical Immunization. The Immune Response*, 695–749.
- Malm, M., Heinimäki, S., Vesikari, T., & Blazevic, V. (2017). Rotavirus capsid VP6 tubular and spherical nanostructures act as local adjuvants when co-delivered with norovirus VLPs. *Clinical & Experimental Immunology*, 189(3), 331-341.
- Manzano-Szalai, K., Thell, K., Willensdorfer, A., Weghofer, M., Pfanzagl, B., Singer, J., Ritter, M., Stremnitzer, C., Flaschberger, I., Michaelis, U., & Jensen-Jarolim, E. (2014). Adeno-associated virus-like particles as new carriers for B-cell vaccines: testing immunogenicity and safety in BALB/c mice. *Viral immunology*, 27(9), 438-448.
- Marichal-Gallardo, P., Pieler, M. M., Wolff, M. W., & Reichl, U. (2017). Steric exclusion chromatography for purification of cell culture-derived influenza A virus using regenerated cellulose membranes and polyethylene glycol. *Journal of Chromatography A*, 1483, 110-119.
- Martín-Acebes, M. A., Saiz, J. C., & Jiménez de Oya, N. (2018). Antibody-dependent enhancement and zika: real threat or phantom menace?. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 44.

- Martínez, J., Hernández, J. C., & Urcuqui-Inchima, S. (2017). Papel de las células dendríticas en la infección por el virus dengue: blancos de replicación y respuesta inmune. *Revista chilena de infectología*, 34(3), 249-256.
- Mason, P. W., Baxt, B., Brown, F., Harber, J., Murdin, A., & Wimmer, E. (1993). Antibody-complexed foot-and-mouth disease virus, but not poliovirus, can infect normally insusceptible cells via the Fc receptor. *Virology*, 192(2), 568-577.
- Maurer, A. C., & Weitzman, M. D. (2020). Adeno-Associated Virus Genome Interactions Important for Vector Production and Transduction. *Human Gene Therapy*, 31(9-10), 499-511.
- Maurer, A. C., Diaz, A. K. C., & Vandenberghe, L. H. (2019). Residues on adeno-associated virus capsid lumen dictate interactions and compatibility with the assembly-activating protein. *Journal of Virology*, 93(7).
- McCloskey, B., & Endericks, T. (2017). The rise of Zika infection and microcephaly: what can we learn from a public health emergency?. *Public health*, 150, 87-92.
- McKnight, P. E., & Najab, J. (2010). Mann-Whitney U Test. *The Corsini encyclopedia of psychology*, 1-1.
- McNeil, C. J., & Shetty, A. K. (2017). Zika virus: A serious global health threat. *Journal of Tropical Pediatrics*, 63(3), 242-248.
- Meier, A. F., Fraefel, C., & Seyffert, M. (2020). The Interplay between Adeno-Associated Virus and its Helper Viruses. *Viruses*, 12(6), 662.
- Mena, J., Ramirez, O. T., Palomares, L. (2003). Titration of nonoccluded baculovirus using a cell viability assay. *Biotechniques* 34, 260–264.
- Mena-Enriquez, M., Flores-Contreras, L., & Armendáriz-Borunda, J. (2012). Vectores virales adeno-asociados: métodos de producción, purificación y aplicaciones en terapia génica. *Revista de Investigación Clínica*, 64(5), 487-494.
- Merritt II, J. L., Nguyen, T., Daniels, J., Matern, D., & Schowalter, D. B. (2009). Biochemical correction of very long-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency following adeno-associated virus gene therapy. *Molecular Therapy*, 17(3), 425-429.
- Merten, O. W., Geny-Fiamma, C., & Douar, A. M. (2005). Current issues in adeno-associated viral vector production. *Gene therapy*, 12(1), S51-S61.
- Mietzsch, M., Grasse, S., Zurawski, C., Weger, S., Bennett, A., Agbandje-McKenna, M., Muzyczka, N., Zolotukhin, S., & Heilbronn, R. (2014). OneBac: platform for scalable and high-titer production of adeno-associated virus serotype 1–12 vectors for gene therapy. *Human gene therapy*, 25(3), 212-222.

- Monsma, S. A., Oomens, A. G., & Blissard, G. W. (1996). The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. *Journal of virology*, 70(7), 4607-4616.
- Moore, A. R., Dong, B., Chen, L., & Xiao, W. (2015). Vaccinia virus as a subhelper for AAV replication and packaging. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 2, 15044.
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*, 3(1), 13-22.
- Muller, S. (1999). Peptides in diagnosis of autoimmune diseases. In *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (Vol. 28, pp. 247-280). Elsevier.
- Munar, B. A. C., Parra, J. E. C., & Panduro, M. H. R. (2019). Amplificación de la infección dependiente de anticuerpos en la inmunopatogénesis del dengue grave, implicaciones para el desarrollo y uso de las vacunas. *Acta Biológica Colombiana*, 24(3), 439-451.
- Murphy, S. J., & Vile, R. G. (2002). Hybrid Adenoviral Vectors. In *Adenoviral Vectors for Gene Therapy* (pp. 481-531). Academic Press.
- Naso, M. F., Tomkowicz, B., Perry, W. L., & Strohl, W. R. (2017). Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene therapy. *BioDrugs*, 31(4), 317-334.
- Nass, S. A., Mattingly, M. A., Woodcock, D. A., Burnham, B. L., Ardinger, J. A., Osmond, S. E., Frederick, A. M., Scaria, A., Cheng, S. H., & O'Riordan, C. R. (2018). Universal method for the purification of recombinant AAV vectors of differing serotypes. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 9, 33-46.
- National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)-National Institute of Health (NIH). (2019, Julio 1). <https://www.niaid.nih.gov/research/vaccine-types>
- Nieto, K., & Salvetti, A. (2014). AAV vectors vaccines against infectious diseases. *Frontiers in immunology*, 5, 5.
- Nieto, K., Weghofer, M., Sehr, P., Ritter, M., Sedlmeier, S., Karanam, B., Seitz, H., Müller, M., Kellner, M., Hörer, M., Michaelis, U., Roden, R. B. S., Gissmann, L., & Kleinschmidt, J. A. (2012). Development of AAVLP (HPV16/31L2) particles as broadly protective HPV vaccine candidate. *PloS one*, 7(6), e39741.
- Norazharuddin, H., & Lai, N. S. (2018). Roles and Prospects of Dengue Virus Non-structural Proteins as Antiviral Targets: An Easy Digest. *The Malaysian journal of medical sciences: MJMS*, 25(5), 6.
- O'Rourke, J. P., Daly, S. M., Triplett, K. D., Peabody, D., Chackerian, B., & Hall, P. R. (2014). Development of a mimotope vaccine targeting the *Staphylococcus aureus* quorum sensing pathway. *PloS one*, 9(11), e111198.

- Offerdahl, D. K., Dorward, D. W., Hansen, B. T., & Bloom, M. E. (2017). Cytoarchitecture of Zika virus infection in human neuroblastoma and *Aedes albopictus* cell lines. *Virology*, 501, 54-62.
- O'Reilly, D. R., Miller, L. K., & Luckow, V. A. (1994). *Baculovirus expression vectors: a laboratory manual*. Oxford University Press on Demand.
- Paixão, E. S., Teixeira, M. G., & Rodrigues, L. C. (2017). Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. *BMJ Glob Health* 3: e000530.
- Palomares, L. A., Pedroza, J. C., & Ramírez, O. T. (2001). Cell size as a tool to predict the production of recombinant protein by the insect-cell baculovirus expression system. *Biotechnology letters*, 23(5), 359-364.
- Palomares, L. A., Realpe, M., & Ramírez, O. T. (2015). An overview of cell culture engineering for the insect cell-baculovirus expression vector system (BEVS). In *Animal Cell Culture* (pp. 501-519). Springer, Cham.
- Pandey, S. C., Pande, V., Sati, D., Upreti, S., & Samant, M. (2020). Vaccination strategies to combat novel corona virus SARS-CoV-2. *Life Sciences*, 117956.
- Penaud-Budloo, M., François, A., Clément, N., & Ayuso, E. (2018). Pharmacology of recombinant adeno-associated virus production. *Molecular Therapy- Methods & Clinical Development*, 8, 166-180.
- Perera, R., & Kuhn, R. J. (2008). Structural proteomics of dengue virus. *Current opinion in microbiology*, 11(4), 369-377.
- Pierson, T. C., & Diamond, M. S. (2018). The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. *Nature*, 560(7720), 573-581.
- Poland, G. A., Ovsyannikova, I. G., & Kennedy, R. B. (2019, December). Zika vaccine development: current status. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 94, No. 12, pp. 2572-2586). Elsevier.
- Priddy, F. H., Lewis, D. J. M., Gelderblom, H. C., Hassanin, H., Streatfield, C., LaBranche, C., Hare, J., Cox, J. H., Dally, L., Bendel, D., Montefiori, D., Sayeed, E., Ackland, J., Gilmour, J., Schnepf, B. C., Wright, J. F., & Johnson, P. (2019). Adeno-associated virus vectored immunoprophylaxis to prevent HIV in healthy adults: a phase 1 randomised controlled trial. *The Lancet HIV*, 6(4), e230-e239.
- Rauch, S., Jasny, E., Schmidt, K. E., & Petsch, B. (2018). New vaccine technologies to combat outbreak situations. *Frontiers in immunology*, 9, 1963.
- Rayaprolu, V., Kruse, S., Kant, R., Venkatakrisnan, B., Movahed, N., Brooke, D., Lins, B., Bennett, A., Potter, T., McKenna, R., Agbandje-McKenna, M., & Bothner, B. (2013). Comparative analysis of adeno-associated virus capsid stability and dynamics. *Journal of virology*, 87(24), 13150-13160.

- Redoni, M., Yacoub, S., Rivino, L., Giacobbe, D. R., Luzzati, R., & Di Bella, S. (2020). Dengue: Status of current and under-development vaccines. *Reviews in Medical Virology*, e2101.
- Rey, F. A., Stiasny, K., Vaney, M. C., Dellarole, M., & Heinz, F. X. (2018). The bright and the dark side of human antibody responses to flaviviruses: lessons for vaccine design. *EMBO reports*, 19(2), 206-224.
- Richner, J. M., Himansu, S., Dowd, K. A., Butler, S. L., Salazar, V., Fox, J. M., Julander, J. G., Tang, W. W., Shresta, S., Pierson, T. C., Ciaramella, G., & Diamond, M. S. (2017). Modified mRNA vaccines protect against Zika virus infection. *Cell*, 168(6), 1114-1125.
- Richter, M. K. S., da Silva Voorham, J. M., Torres Pedraza, S., Hoornweg, T. E., van de Pol, D. P. I., Rodenhuis-Zybert, I. A., Wilschut, J., & Smit, J. M. (2014). Immature dengue virus is infectious in human immature dendritic cells via interaction with the receptor molecule DC-SIGN. *PloS one*, 9(6), e98785.
- Robinson Jr, W. E., Montefiori, D., & Mitchell, W. (1988). Antibody-dependent enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection. *The Lancet*, 331(8589), 790-794.
- Sanchez-Trincado, J. L., Gomez-Perosanz, M., & Reche, P. A. (2017). Fundamentals and methods for T-and B-cell epitope prediction. *Journal of immunology research*, 2017.
- Schaefer, T. J., Panda, P. K. & Wolford R. W. (2020). Dengue Fever. [Updated 2020 Apr 24]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430732/>
- Sevilla Tapia, L. (2018). Generación de vectores de virus adenoasociados en el sistema células de insecto-baculovirus para el tratamiento de la hiperamonemia crónica por medio de terapia génica. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Shang, W., Yang, Y., Rao, Y., & Rao, X. (2020). The outbreak of SARS-CoV-2 pneumonia calls for viral vaccines. *npj Vaccines*, 5(1), 1-3.
- Shao, W., Paul, A., Abbasi, S., Chahal, P. S., Mena, J. A., Montes, J., Kamen, A., & Prakash, S. (2012). A novel polyethyleneimine-coated adeno-associated virus-like particle formulation for efficient siRNA delivery in breast cancer therapy: preparation and in vitro analysis. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 1575.
- Shen, X., Storm, T., & Kay, M. A. (2007). Characterization of the relationship of AAV capsid domain swapping to liver transduction efficiency. *Molecular Therapy*, 15(11), 1955-1962.
- Singer, J., Manzano-Szalai, K., Fazekas, J., Thell, K., Bentley-Lukschal, A., Stremnitzer, C., Roth-Walter, F., Weghofer, M., Ritter, M., Pino Tossi, K., Hörer, M., Michaelis, U., & Jensen-Jarolim, E. (2016). Proof of concept study

- with an HER-2 mimotope anticancer vaccine deduced from a novel AAV-mimotope library platform. *Oncoimmunology*, 5(7), e1171446.
- Snapper, C. M. (2018). Distinct immunologic properties of soluble versus particulate antigens. *Frontiers in immunology*, 9, 598.
- Song, B. H., Yun, S. I., Woolley, M., & Lee, Y. M. (2017). Zika virus: history, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *Journal of neuroimmunology*, 308, 50-64.
- Steward. (2001). The development of a mimotope-based synthetic peptide vaccine against respiratory syncytial virus. *Biologicals*, 29: 215–9.
- Suhrbier, A., & La Linn, M. (2003). Suppression of antiviral responses by antibody-dependent enhancement of macrophage infection. *Trends in immunology*, 24(4), 165-168.
- Sui, D., Wang, K., Park, H., & Chae, J. (2014). Bright field microscopic cells counting method for BEVS using nonlinear convergence index sliding band filter. *Biomedical engineering online*, 13(1), 1-17.
- Sun, J., Du, S., Zheng, Z., Cheng, G., & Jin, X. (2020). Defeat Dengue and Zika Viruses With a One-Two Punch of Vaccine and Vector Blockade. *Frontiers in Microbiology*, 11, 362.
- Suwanmanee, S., & Luplertlop, N. (2017). Dengue and Zika viruses: lessons learned from the similarities between these Aedes mosquito-vectored arboviruses. *Journal of Microbiology*, 55(2), 81-89.
- Szalai, K., Jensen-Jarolim, E., & Pali-Scholl, I. (2008). Vaccination strategies based on the mimotope concept. *Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia*, 143(2), 95-104.
- Tai, W., He, L., Wang, Y., Sun, S., Zhao, G., Luo, C., Li, P., Zhao, H., Fremont, D. H., Li, F., Jiang, S., Zhou, Y., & Du, L. (2018). Critical neutralizing fragment of Zika virus EDIII elicits cross-neutralization and protection against divergent Zika viruses. *Emerging microbes & infections*, 7(1), 1-8.
- Takada, A., & Kawaoka, Y. (2003). Antibody-dependent enhancement of viral infection: molecular mechanisms and in vivo implications. *Reviews in medical virology*, 13(6), 387-398.
- Takada, A., Watanabe, S., Okazaki, K., Kida, H., & Kawaoka, Y. (2001). Infectivity-enhancing antibodies to Ebola virus glycoprotein. *Journal of virology*, 75(5), 2324-2330.
- Tang, B., Xiao, Y., & Wu, J. (2016). Implication of vaccination against dengue for Zika outbreak. *Scientific reports*, 6, 35623.
- Teramoto, T., Huang, X., Armbruster, P. A., & Padmanabhan, R. (2019). Infection of *Aedes albopictus* mosquito C6/36 cells with the wMelpop strain of *Wolbachia* modulates dengue virus-induced host cellular transcripts and induces critical

- sequence alterations in the dengue viral genome. *Journal of virology*, 93(15), e00581-19.
- Thisyakorn, U., & Tantawichien, T. (2020). Dengue Vaccine: A Key for Prevention. *Expert Review of Vaccines*.
- Thomas, S. J., & Barrett, A. (2020). Zika vaccine pre-clinical and clinical data review with perspectives on the future development. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 1-13.
- Thomas, S. J., & Yoon, I. K. (2019). A review of Dengvaxia®: Development to deployment. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 15(10), 2295-2314.
- Thomas, S. J., Endy, T. P., Rothman, A. L., & Barrett, A. (2014). Flaviviruses (dengue, yellow fever, Japanese encephalitis, West Nile encephalitis, St. Louis encephalitis, tick-borne encephalitis, Kyasanur forest disease, Alkhurma hemorrhagic fever, Zika). In Mandell, Douglas, and Bennett's *Principles and Practice of Infectious Diseases* (pp. 1881-1903). Elsevier Inc.
- Tirado, S. M. C., & Yoon, K. J. (2003). Antibody-dependent enhancement of virus infection and disease. *Viral immunology*, 16(1), 69-86.
- Tseng, C. C., & Li, C. S. (2007). Inactivation of viruses on surfaces by ultraviolet germicidal irradiation. *Journal of occupational and environmental hygiene*, 4(6), 400-405.
- Uribe Romero, S. J. (2020). Producción de partículas pseudovirales de ZikV en células de mamífero de forma estable y en células de insecto. Tesis de maestría en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Valdés Rodríguez, Y. C., Bilbao Díaz, M., León Álvarez, J. L., & Merchán González, F. (2002). Origen e importancia de la fosfolipasa A2 de secreción. *Revista Cubana de Farmacia*, 36(2), 121-128.
- Van Regenmortel, M. H. V. (2008). Antigenicity and immunogenicity of viral proteins.
- Vartak, A., & Sucheck, S. J. (2016). Recent advances in subunit vaccine carriers. *Vaccines*, 4(2), 12.
- Verhoef, J. J., & Anchordoquy, T. J. (2013). Questioning the use of PEGylation for drug delivery. *Drug delivery and translational research*, 3(6), 499-503.
- Versteeg, L., Almutairi, M. M., Hotez, P. J., & Pollet, J. (2019). Enlisting the mRNA vaccine platform to combat parasitic infections. *Vaccines*, 7(4), 122.
- Vironova. (Sin fecha). Vironova AB. <https://www.vironova.com/analyze/size-distribution-analysis>
- Wang, Q., Yang, H., Liu, X., Dai, L., Ma, T., Qi, J., Wong, G., Peng, R., Liu, S., Li, J., Li, S., Song, J., Liu, J., He, J., Yuan, H., Xiong, Y., Liao, Y., Li, J., Yang, J., Tong, Z., Griffin, B. D., Bi, Y., Liang, M., Xu, X., Qin, C., Cheng, G., Zhang, X., Wang, P., Qiu, X., Kobinger, G., Shi, Y., Yan, J., & Gao, G. F. (2016). Molecular determinants of human neutralizing antibodies isolated from a

- patient infected with Zika virus. *Science translational medicine*, 8(369), 369ra179-369ra179.
- Wang-Lin, S. X., Olson, R., Beanan, J. M., MacDonald, U., Russo, T. A., & Balthasar, J. P. (2019). Antibody dependent enhancement of *Acinetobacter baumannii* infection in a mouse pneumonia model. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 368(3), 475-489.
- Weiss, R. C., & Scott, F. W. (1981). Antibody-mediated enhancement of disease in feline infectious peritonitis: comparisons with dengue hemorrhagic fever. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 4(2), 175-189.
- Wen, J., & Shresta, S. (2019). Antigenic cross-reactivity between Zika and dengue viruses: is it time to develop a universal vaccine?. *Current opinion in immunology*, 59, 1-8.
- Wen, Z., Song, H., & Ming, G. L. (2017). How does Zika virus cause microcephaly?. *Genes & development*, 31(9), 849-861.
- Williams, G. V., & Faulkner, P. (1997). Cytological changes and viral morphogenesis during baculovirus infection. In *The baculoviruses* (pp. 61-107). Springer, Boston, MA.
- Wirawan, M., Fibriansah, G., Marzinek, J. K., Lim, X. X., Ng, T.-S., Sim, A. Y. L., Zhang, Q., Kostyuchenko, V. A., Shi, J., Smith, S. A., Verma, C. S., Anand, G., Crowe, J. E., Jr., Bond, P. J., & Lok, S.-M. (2019). Mechanism of enhanced immature dengue virus attachment to endosomal membrane induced by prM antibody. *Structure*, 27(2), 253-267.
- Wistuba, A., Weger, S., Kern, A., & Kleinschmidt, J. A. (1995). Intermediates of adeno-associated virus type 2 assembly: identification of soluble complexes containing rep and cap proteins. *Journal of Virology*; 69:5311-5319.
- Wobus, C. E., Hügler-Dörr, B., Girod, A., Petersen, G., Hallek, M., & Kleinschmidt, J. A. (2000). Monoclonal antibodies against the adeno-associated virus type 2 (AAV-2) capsid: epitope mapping and identification of capsid domains involved in AAV-2–cell interaction and neutralization of AAV-2 infection. *Journal of virology*, 74(19), 9281-9293.
- World Health Organization (WHO). (2020). WHO vaccine pipeline tracker. Disponible en: https://www.who.int/immunization/research/vaccine_pipeline_tracker_spreadsheet/en/ (Consultado el 09 de agosto del 2020)
- Xiao, Y., & Isaacs, S. N. (2012). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and blocking with bovine serum albumin (BSA)—not all BSAs are alike. *Journal of immunological methods*, 384(1-2), 148-151.
- Zeltins, A. (2013). Construction and characterization of virus-like particles: a review. *Molecular biotechnology*, 53(1), 92-107.

- Zhao, L., Kopylov, M., Potter, C. S., Carragher, B., & Finn, M. G. (2019). Engineering the PP7 virus capsid as a peptide display platform. *ACS nano*, 13(4), 4443-4454.
- Zimmermann, N., Thormann, V., Hu, B., Köhler, A., Imai-Matsushima, A., Locht, C., Arnett, E., Schlesinger, L. S., Zoller, T., Schürmann, M., Kaufmann, S. H., & Wardemann, H. (2016). Human isotypedependent inhibitory antibody responses against *Mycobacterium tuberculosis*. *EMBO Mol Med* 8: 1325–1339.
- Zolotukhin, S., Byrne, B., Mason, E., Zolotukhin, I., Potter, M., Chesnut, K., Summerford, C., Samulski, R., & Muzyczka, N. (1999). Recombinant adenoassociated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther.* 6:973–985.

10. ANEXOS

Anexo 1. Plásmidos empleados en este trabajo

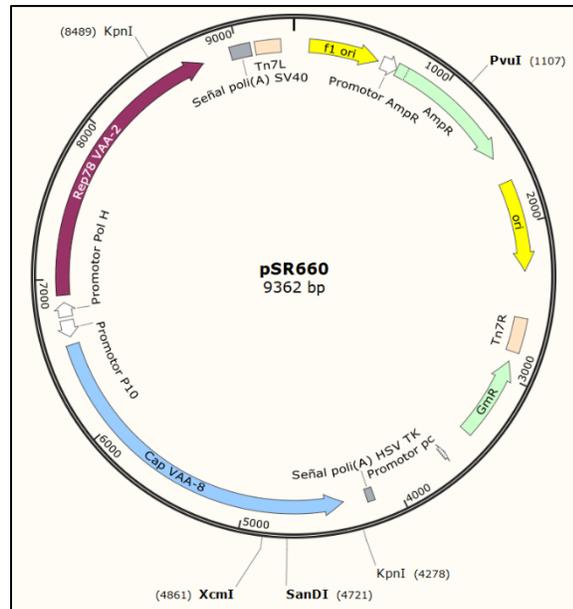


Figura A1. Plásmido pSR660. Este contiene el gen *cap* de VAA-8, el cual codifica para las proteínas estructurales (VPs) de VAA de serotipo 8. Visualizado con SnapGene™ 1.1.3.

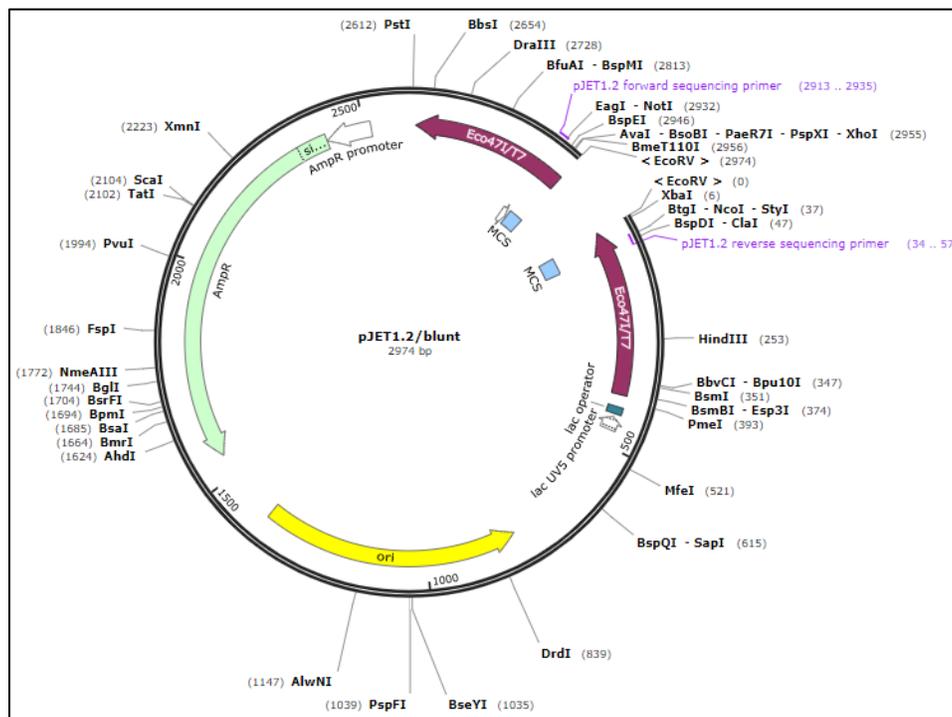


Figura A2. Plásmido pJET1.2/blunt. Este se empleó para la clonación del fragmento 301 gBlock (tomado del repositorio de SnapGene).

Anexo 2. Verificación de la secuencia del gen *cap* del VAA-8 y del promotor P₁₀ en el vector pSR660

De igual manera que en 5.4., se transformaron células quimiocompetentes de *E. coli* One Shot™ TOP10 con el vector pSR660. Se seleccionaron cuatro colonias y se evaluaron por patrón de restricción con la enzima KpnI (New England Biolabs), la reacción de digestión se realizó durante 2 horas a 37 °C.

Para verificar la secuencia del gen *cap* y del promotor P₁₀ por PCR y secuenciación, se diseñaron y se mandaron a sintetizar los oligonucleótidos F2Cap, R2Cap, F3Cap y R3Cap (tabla A1). Además, también se emplearon los oligonucleótidos F1Cap y R1Cap (tabla A2).

Tabla A1. Oligonucleótidos mandados a sintetizar para verificar la secuencia del gen *cap* de virus adeno-asociado del serotipo 8 y del promotor P₁₀ dentro del vector pSR660.

Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Tamaño esperado del amplicón (pb)
F2Cap	GTTGGCGGTAACAGGGTCCT	834
R2Cap	CAATGGCAGACAATAACGAAGGCG	
F3Cap	GTGGAATCGCAATGCCAAT	1006
R3Cap	GATGGTGGGACGGTATGAATA	

Las sumas de los amplicones generados con los tres pares de oligonucleótidos cubren toda la secuencia del promotor P₁₀ y del gen *cap* de VAA-8. Para verificar el tamaño esperado de los amplicones, se realizaron tres PCR. Los PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl; se emplearon 0.5 µl de oligonucleótidos (10 µM), 2.5 µl del buffer de la enzima Taq DNA polimerasa (10X), 0.5 µl de dNTPs (10 mM), 0.125 µl de la enzima Taq DNA polimerasa (5U/µl) (New England Biolabs), 12 ng del DNA templado de una colonia seleccionada y agua. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 30 segundos a 95 °C; 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a las temperaturas de hibridación evaluadas para cada par de oligonucleótidos (tabla A2) (gradiente de temperatura), 1 minuto a 68 °C; y, 5

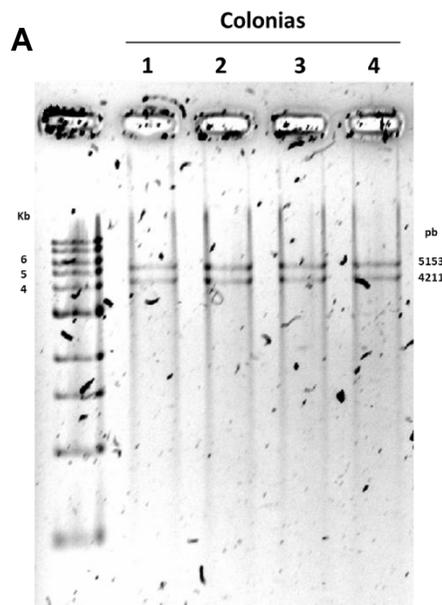
minutos a 68 °C para la extensión final. Los productos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

Tabla A2. Temperaturas de hibridación evaluadas de los oligonucleótidos empleados en la PCR para la verificación de la secuencia del gen cap de virus adeno-asociado del serotipo 8 y del promotor P₁₀.

Par de Oligonucleótidos	Temperaturas de hibridación evaluadas(°C)
F1Cap y R1Cap	65, 64.1, 62.6, 60.3, 57.6 y 55.3
F2Cap y R2Cap	65, 64.1, 62.6, 60.3, 57.6 y 55.3
F3Cap y R3Cap	62.6, 60.3, 57.6, 55.3, 53.8 y 53

Finalmente, se mandó a secuenciar el plásmido pSR660, de una colonia seleccionada, con los oligonucleótidos de la tabla A1, y los F1Cap y R1Cap.

Los resultados de la evaluación con la enzima de restricción, los PCR y el esquema seguido para analizar los resultados de secuenciación se muestran en la figura A3.



los pares de oligonucleótidos F1Cap-R1Cap y F2Cap-R2Cap amplifican los productos esperados de 912 pb y 834 pb, respectivamente, y además otros amplicones inespecíficos. El par de oligonucleótidos F3Cap-R3Cap solo amplificó el fragmento esperado (1006 pb). En la Figura A3D se observa el esquema que se siguió para verificar la secuencia del gen *cap* del VAA-8 y del promotor P₁₀ en el vector pSR660. Los cromatogramas de las secuencias obtenidas con los seis oligonucleótidos se visualizaron mediante el software A plasmid Editor v2.0.51 (ApE), y posteriormente al alinearse con las secuencias esperadas, se pudo verificar la identidad de secuencia al 100%.

Anexo 3. Secuencia 301 gBlock

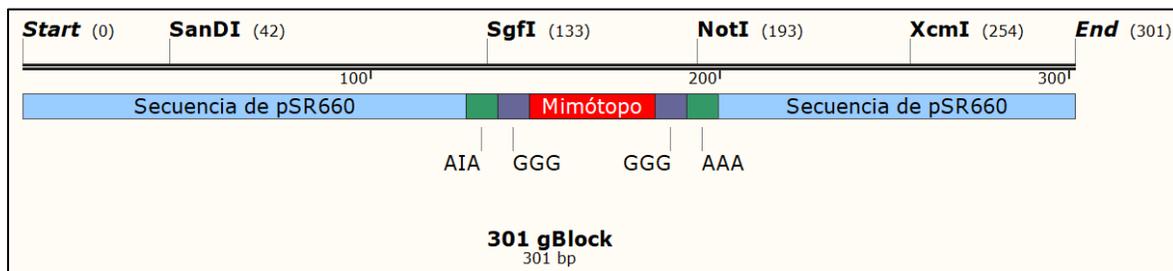


Figura A4. Fragmento 301 gBlock visualizado con SnapGene™ 1.1.3.

Anexo 4. Evaluación de la actividad de las enzimas KflI y XcmI

Antes de realizar la digestión tanto del vector pSR660 y del fragmento 301 gBlock con las enzimas XcmI y KflI para ligarlos posteriormente, se evaluó la actividad de las enzimas XcmI y KflI. Según los fabricantes la enzima XcmI en 1 hora a 37 °C digiere totalmente 1 µg de DNA y la enzima KflI en 15 minutos a 37 °C digiere totalmente 1 µg de DNA, sin embargo, cuando se evaluaron estas condiciones de digestión en el vector pSR660 mediante electroforesis en gel de agarosa, se observaron bandas que no corresponden al tamaño esperado del vector lineal, lo

cual indica que en dichas condiciones de digestión las enzimas no cortan todo el vector. Luego se volvió a digerir pSR660, pero ahora con 3 horas de digestión para cada una, y se volvieron a evaluar las condiciones de digestión mediante electroforesis (Figura A5).

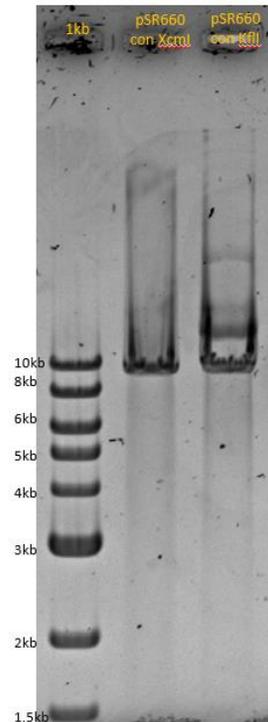


Figura A5. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del vector pSR660 digerido con XcmI y con KfiI durante 3 horas.

En la Figura A5 se muestra que la enzima XcmI digirió completamente a 1 µg de vector pSR660, ya que, se observa una sola banda que correspondería al vector pSR660 lineal (9362 pb), mientras que la enzima KfiI lo digirió parcialmente. Se pueden seguir evaluando más condiciones de digestión, pero como solo se contaba con 12 reacciones más del producto KfiI (ThermoFisher Scientific), se decidió emplear estas condiciones de digestión para realizar la construcción de pSR660M1.

Anexo 5. Sitios de corte para proteasas dentro del inserto de 24 aa y proteasas codificadas por las células Sf9 y el baculovirus

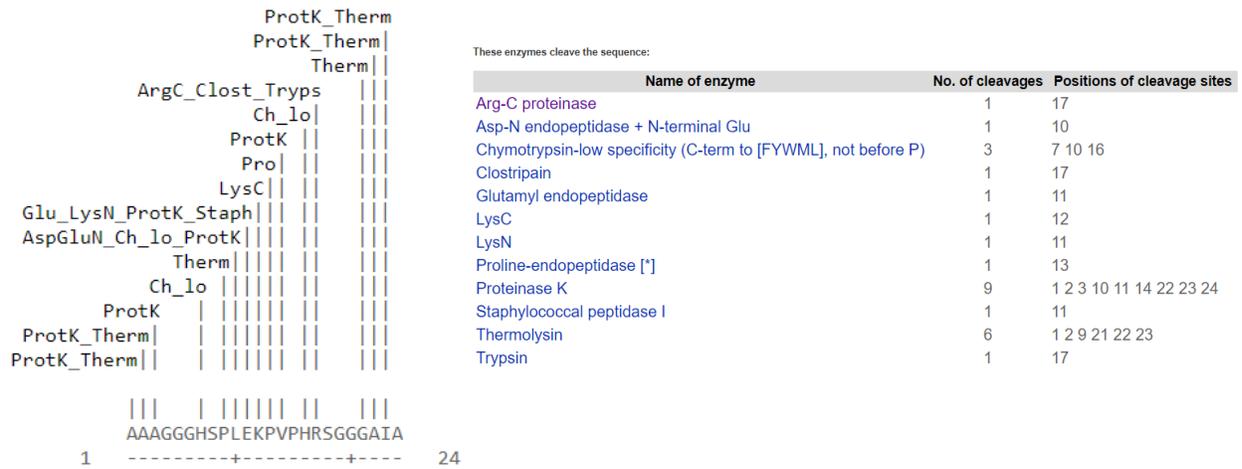


Figura A6. Sitios de corte para proteasas identificados dentro del inserto de 24 aa. Sitios identificados con PeptideCutter.

A

Clan	Family	MEROPS ID	Peptidase or homologue (subtype)
CA	C1	C01.060	cathepsin B
CA	C1	C01.067	insect 26/29 kDa peptidase
CA	C1	C01.067	insect 26/29 kDa peptidase
CA	C1	C01.092	cathepsin L1 (arthropod-type)
CD	C14	C14.015	caspase (insect 1)
CD	C14	unassigned	subfamily C14A unassigned peptidases
CD	C14	unassigned	subfamily C14A unassigned peptidases
CD	C14	unassigned	subfamily C14A unassigned peptidases
MA	M12	unassigned	family M12 unassigned peptidases
MA	M12	unassigned	family M12 unassigned peptidases
MC	M14	M14.024	insect gut carboxypeptidase-1
MH	M20	unassigned	subfamily M20A unassigned peptidases
PA	S1	S01.040	chymotrypsin-like enzyme (Lepidoptera)
PA	S1	S01.112	cocoonase
PA	S1	unassigned	subfamily S1A unassigned peptidases
PA	S1	unassigned	subfamily S1A unassigned peptidases
PA	S1	unassigned	subfamily S1A unassigned peptidases
PA	S1	unassigned	subfamily S1A unassigned peptidases
PA	S1	unassigned	subfamily S1A unassigned peptidases
PA	S1	unassigned	subfamily S1A unassigned peptidases
PA	S1	unassigned	subfamily S1A unassigned peptidases
PA	S1	unassigned	subfamily S1A unassigned peptidases
PA	S1	unassigned	subfamily S1A unassigned peptidases
PA	S1	unassigned	subfamily S1A unassigned peptidases
PB	T2	T02.001	glycosylasparaginase precursor
PC	C26	C26.952	dihydro-rotase (N-terminal unit) (<i>Homo sapiens</i> -type)
SB	S8	unassigned	subfamily S8B unassigned peptidases
SC	S9	S09.001	prolyl oligopeptidase

B

Clan	Family	MEROPS ID	Peptidase or homologue (subtype)
CA	C1	C01.083	V-cath peptidase

Figura A7. Proteasas codificadas por el sistema células de insecto-baculovirus. (A) Proteasas codificadas por las células Sf9. (B) Proteasas codificadas por el baculovirus. Localizadas en la base de datos MEROPS.

Anexo 6. Cromatografía de exclusión estérica y cromatografía de afinidad para la purificación de cápsides de VAA-8

Cromatografía de exclusión estérica

Clarificados obtenidos en el proceso de extracción de cápsides, descrito en 5.9.1, se sometieron al proceso de purificación por cromatografía de exclusión estérica para obtener cápsides nativas y modificadas puras de VAA-8. El proceso empleado se basó en el reportado por Marichal-Gallardo *et al.* (2017) para purificar virus de la influenza A.

La cromatografía se realizó en un sistema FPLC ÄKTAprime plus (GE Healthcare, Waukesha, EUA) acoplado a un sistema de adquisición de datos PrimeView (GE Healthcare) para monitorear absorbancia (280 nm), conductividad y pH. El clarificado se mezcló con PBS o con PEG al 16% para diluirlo hasta obtener una concentración de PEG al 8%, luego la mezcla se sometió a cromatografía a través de un portafiltros de acero inoxidable (Whatman) (Figura A8A) empacado con 15 membranas de celulosa regenerada con un tamaño de poro de 1 μm y 25 mm de diámetro (GE Healthcare). Todo el proceso se realizó a un flujo de 2 mL/min. El sistema se equilibró con polietilenglicol-6000 (PEG-6000) al 8% en PBS a pH 7.4. La elución se realizó mediante la reducción de PEG-6000 a 0% en la fase móvil. Posteriormente, los volúmenes obtenidos de la elución fueron dializados utilizando una membrana Spectra/por (Spectrumlabs) con un tamaño de corte de 100 kDa y una solución de diálisis de PBS 1X a un pH de 7.4, con la finalidad de remover residuos de PEG. Se utilizó un volumen de solución de diálisis de 100 veces el volumen que se dializó. La diálisis se realizó en agitación y a 4 °C. La solución de diálisis se cambió a las 2, 6 y 10 horas después de iniciar el proceso. Luego de la diálisis, las muestras se concentraron por centrifugación en tubos Corning® Spin-X® como se describe en 5.9.3.

El proceso se evaluó a través de SDS-PAGE, MET y Dot blot. En la figura A8 se muestran los resultados del proceso de cromatografía de exclusión estérica.

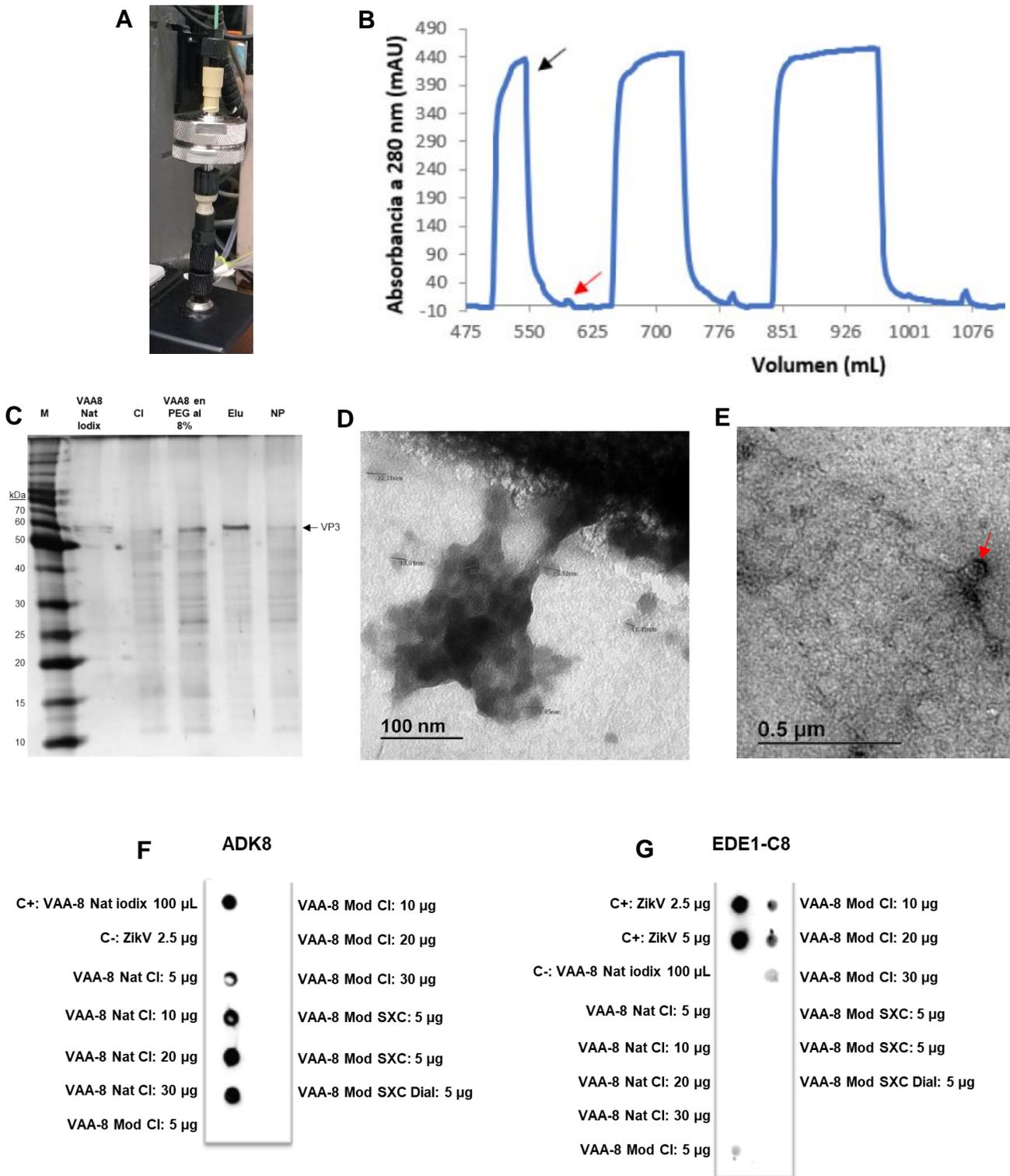


Figura A8. Cromatografía de exclusión estérica para la purificación de cápsides de virus adeno-asociado del serotipo 8. (A) Portafiltros de acero empacado con membranas de celulosa regenerada y conectado al sistema FPLC ÄKTAprime plus. (B) Cromatograma típico de la exclusión estérica para

cápsides de VAA-8. Se observan los picos 1 y 2 de 3 inyecciones de muestra. La flecha negra señala al “*flow-through*” (pico 1) y la flecha roja señala a los componentes obtenidos a través de la elución (pico 2). (C) SDS-PAGE-tinción con nitrato de plata del proceso de purificación de cápsides nativas de VAA-8. M: marcador Benchmark, VAA8 Nat iodix: cápsides nativas de VAA-8 purificadas por gradiente de iodixanol, CI: clarificado de células Sf9 infectadas con bacRep Cap 2/8, VAA8 en PEG al 8%: clarificado de células Sf9 infectadas con bacRep Cap 2/8 mezcladas con PEG-6000 al 8%, Elu: componentes obtenidos a través de la elución (pico 2), NP: componentes obtenidos en el “*flow-through*” (pico 1). (D) Micrografía de cápsides nativas de VAA-8 purificadas por cromatografía de exclusión estérica y dializadas, a 50000X de aumento. (E) Micrografía de cápside modificada de VAA-8 (flecha roja) purificada por cromatografía de exclusión estérica y dializada, a 16000X de aumento. (F) Dot blot con el AcM ADK8 para detectar cápsides nativas de VAA-8. (G) Dot blot con el AcM EDE1-C8 para detectar el mimótopo en las cápsides modificadas de VAA-8. En (F) y (G), C+: control positivo, C-: control negativo, VAA-8 Nat iodix: cápsides nativas de VAA-8 purificadas por gradiente de iodixanol, ZikV: sobrenadante de cultivo de células C6/36 infectadas con ZikV, VAA-8 Nat CI: clarificado de células Sf9 infectadas con bacRep Cap 2/8, VAA-8 Mod CI: clarificado de células Sf9 infectadas con bacCapMod, VAA-8 Mod SXC: cápsides modificadas de VAA-8 purificadas por cromatografía de exclusión estérica, VAA-8 Mod SXC Dial: cápsides modificadas de VAA-8 purificadas por cromatografía de exclusión estérica y dializadas. Se muestran la cantidad de proteína total cargada, y el volumen cargado para las cápsides purificadas por gradiente de iodixanol.

En la figura A8B se muestra el cromatograma típico obtenido al inyectar clarificados que contienen cápsides nativas o modificadas de VAA-8. Se inyectaron 40 mL, 80 mL y 120 mL de clarificado diluido 1/4 con PEG al 8%. En todas las inyecciones se obtuvo el pico 2, el cual contiene partículas virales, de acuerdo con el perfil de trabajo de Marichal-Gallardo *et al.* (2017).

Se cuantificó la proteína en las fracciones colectadas, y las muestras se analizaron por SDS-PAGE y tinción con nitrato de plata. En la figura A8C se muestra el resultado del SDS-PAGE para el proceso de purificación de las cápsides nativas de VAA-8. Se cargaron 0.07 µg de cápsides nativas de VAA-8 purificadas por gradiente de iodixanol (VAA8 Nat iodix), 0.5 µg de clarificado de células Sf9 infectadas con bacRep Cap 2/8 (CI), 0.5 µg de clarificado de células Sf9 infectadas con bacRep Cap 2/8 mezcladas con PEG-6000 al 8% (VAA8 en PEG al 8%), 0.5 µg de componentes obtenidos a través de la elución (Elu) y 0.5 µg de componentes obtenidos en el “*flow-through*” (NP). En el carril “Elu” se observa a VP3 enriquecida en comparación a los otros carriles, y se puede afirmar que tiene una pureza mayor al 60%. Los resultados de SDS-PAGE para el proceso de purificación de las cápsides modificadas de VAA-8 muestran varias bandas de menor tamaño a las VPs, las cuales son similares en peso a las bandas producto de proteólisis observadas en las figuras 37A y 37B (resultados no mostrados).

En la figura A8D se observan cápsides nativas de VAA-8 de ~20 nm de diámetro; sin embargo, se observan enmarañadas en lo que sería el PEG, algunas están sueltas, pero aun así no se observan con claridad. Al parecer la diálisis no fue suficiente para remover todo el PEG. Debería optarse por otro método, como la cromatografía de exclusión en gel, para remover el PEG. Por otro lado, en la figura A8E solo se observa una estructura que podría corresponder a una cápside modificada de VAA-8; sin embargo, ésta mide ~60 nm de diámetro, este tamaño sería atípico para un cápside de VAA-8.

En el resultado de Dot blot (Figura A8G) para las cápsides modificadas de VAA-8, no se detecta al mimótopo en la elución de la cromatografía de exclusión estérica, ni en la muestra purificada y dializada. Esto podría deberse a que el PEG residual en las muestras interfiere con el reconocimiento del mimótopo por el AcM EDE1-C8. El análisis de Dot blot no se realizó para las cápsides nativas de VAA-8 purificadas por cromatografía de exclusión estérica.

Al comparar los resultados de purificación por gradiente de iodixanol (Figuras 33 y 37) y cromatografía de exclusión estérica, se logra obtener mayor pureza con el método de gradiente de iodixanol. La cromatografía de exclusión estérica tiene como principal ventaja la purificación de volúmenes grandes (100 mL<) de clarificado en tiempos cortos en comparación al proceso de purificación por gradiente de iodixanol. No obstante, si el PEG-6000 no logra removerse de las cápsides de VAA-8, podría ser un problema para inducir respuesta inmune, debido a que estudios previos indican que partículas cubierta con PEG logran evadir el sistema inmune (Verhoef y Anchordoquy, 2013).

Cromatografía de afinidad

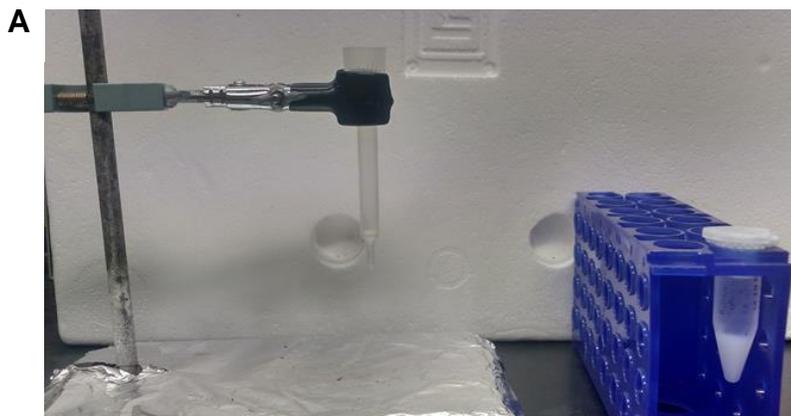
Cápsides modificadas de VAA-8 purificadas por gradiente de iodixanol empleando las proporciones de la variante “Nueva 2”, concentradas y con cambio de solución a PBS, como se describe en 6.3.3 se sometieron al proceso de cromatografía de afinidad para incrementar su grado de pureza. El proceso empleado se basó en el que Uribe (2020) estableció para purificar partículas pseudovirales de ZikV.

La cromatografía se realizó en una columna de polipropileno de baja unión a proteínas y con filtro de polietileno. Se empleó la resina de afinidad Sepharose® 4B AcM EDE1-C8. La resina fue construida por Uribe (2020) a través de la unión covalente entre el AcM EDE1-C8 y la resina Sepharose® 4B activada por bromuro de cianógeno (CNBr).

La purificación se realizó por goteo y por flujo de gravedad. La resina almacenada (1 mL) en PBS 1X pH 7.4, 1 M NaCl y 0.02% de azida de sodio, en un volumen total de 3 mL, se colocó en la columna y se equilibró con 15 volúmenes de columna (VC) de PBS pH 7.4, luego la resina se retiró de la columna y se colocó en un tubo de 5 mL, se esperó a que sedimente, se retiró el sobrenadante y se agregaron 2 mL de muestra (cápsidas modificadas), se mezcló por inversión 1 hora a temperatura ambiente y toda la noche a 4 °C, la resina con muestra se colocó en la columna y se colectaron los componentes no unidos (*“flow-through”*), la resina se lavó con 12 VC de PBS pH 7.4, la elución se realizó con 3 VC de glicina 0.1 M pH 2.75, se colectaron fracciones de 300 uL en microtubos que contenían 60 uL de solución de fosfatos pH 8.0 para la neutralización, la resina se lavó con 3 VC de PBS pH 7.4. Finalmente, la resina se regeneró con 15 VC de NaCl 1 M.

Al proceso de cromatografía de afinidad, se sometieron 115.1 µg de proteína total correspondientes a las cápsidas modificadas purificadas por gradiente de iodixanol.

El proceso se evaluó a través de SDS-PAGE y tinción con nitrato de plata, Western blot y Dot blot. En la figura A9 se muestra el resultado del proceso de purificación por cromatografía de afinidad.



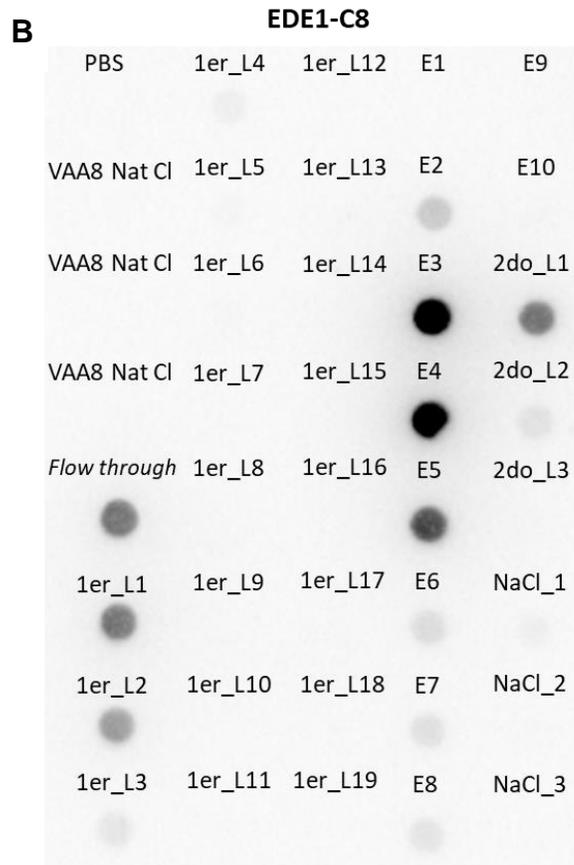


Figura A9. Cromatografía de afinidad para la purificación de cápsides modificadas de virus adenoasociado del serotipo 8. (A) Columna en soporte universal y resina en tubo de 5 mL. (B) Dot blot con el AcM EDE1-C8 para detectar el mimótopo en las cápsides modificadas de VAA-8. PBS: solo PBS 1X pH 7.4, VAA8 Nat Cl: clarificado de células Sf9 infectadas con bacRep Cap 2/8, *Flow-through*: componentes no unidos, 1er_L1 al 1er_L19: colectas durante el primer lavado, E1 al E10: colectas durante la elución, 2do_L1 al 2do_L3: colectas durante el segundo lavado, NaCl_1 al NaCl_3: colectas durante la regeneración.

Se obtuvieron 17.39 µg de proteína total en las fracciones de la elución. No se observaron bandas de VPs de VAA en los resultados de SDS-PAGE y Western blot probablemente porque se cargó poca proteína en los geles (resultados no mostrados). Por otro lado, el resultado de Dot blot (Figura A9B) indica la presencia de cápsides modificadas de VAA-8 que despliegan el mimótopo del epítipo EDE1 en las fracciones colectadas durante la elución (principalmente de E3 a E5). Según este resultado, se sugiere que este paso de purificación adicional a la purificación por gradiente de iodixanol permitiría obtener cápsides modificadas de VAA-8 con

mayor pureza; sin embargo, para afirmar esto se requiere mayor caracterización del proceso de purificación por cromatografía de afinidad.

Anexo 7. Valores de resolución del mapa de densidad electrónica de la cápside modificada de VAA-8

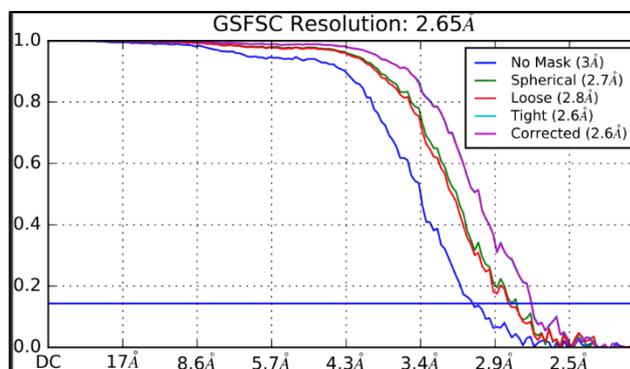


Figura A10. Resolución del mapa de densidad electrónica de la cápside modificada de VAA-8 según diferentes máscaras Resolución del mapa de densidad electrónica de la cápside modificada de VAA-8 según diferentes máscaras Resolución del mapa de densidad electrónica de la cápside modificada de VAA-8 según diferentes máscaras

Anexo 8. Absorbancias de los sueros preinmunes de los ratones empleados en los diseños experimentales de inmunización

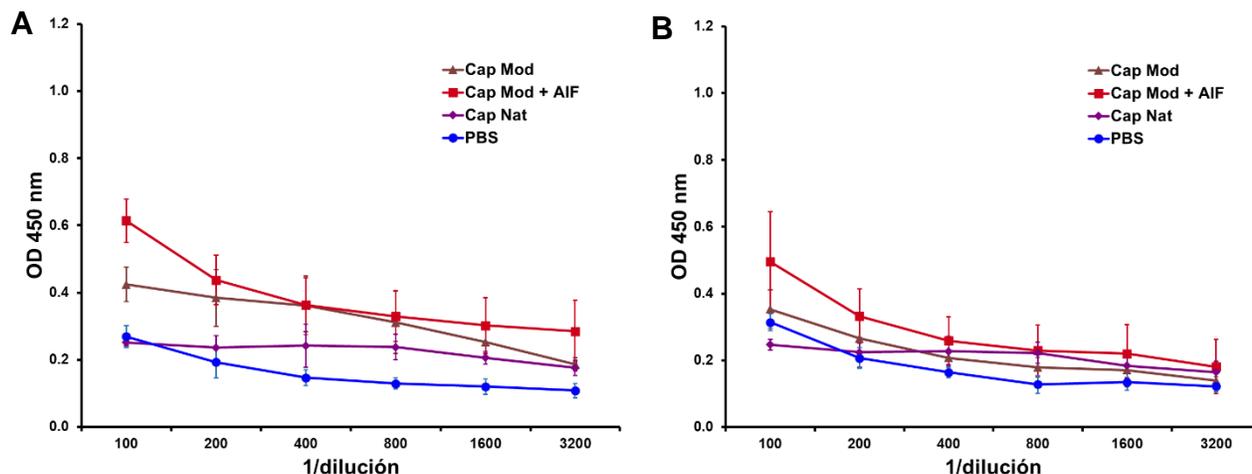


Figura A11. OD a 450 nm de las diluciones seriadas de sueros preinmunes de ratones del primer diseño experimental. (A) Valores de absorbancia de la prueba de ELISA para detectar anticuerpos

IgG anti-DenV-2. (B) Valores de absorbancia de la prueba de ELISA para detectar anticuerpos anti-ZikV. Las curvas representan el promedio de los valores de absorbancia para cada grupo (n = 5) y las barras de error representan la desviación estándar para los valores de absorbancia.

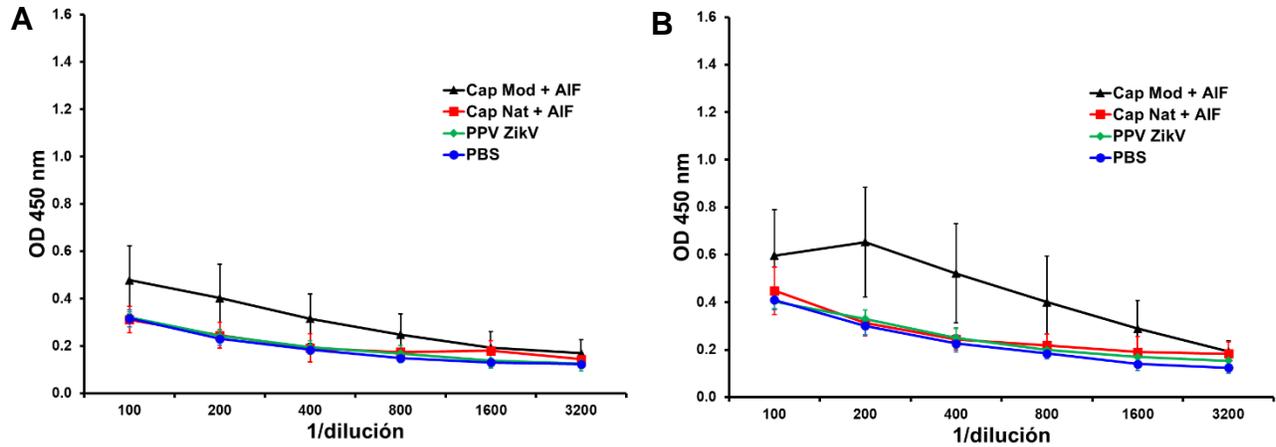


Figura A12. OD a 450 nm de las diluciones seriadas de sueros preinmunes de ratones del segundo diseño experimental. (A) Valores de absorbancia de la prueba de ELISA para detectar anticuerpos anti-DenV-2. (B) Valores de absorbancia de la prueba de ELISA para detectar anticuerpos IgG anti-ZikV. Las curvas representan el promedio de los valores de absorbancia para cada grupo (n = 5) y las barras de error representan la desviación estándar para los valores de absorbancia.