



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Instituto de Biotecnología**

**EXPRESIÓN DE UN ANTICUERPO CONTRA EL EPÍTOPO DEL DÍMERO DE
ENVOLTURA DE LOS FLAVIVIRUS DENGUE Y ZIKA CON EL SISTEMA BACULOVIRUS-
CÉLULAS DE INSECTO**

TESIS

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

PRESENTA

Yahel Francisco López Reyes

TUTORA PRINCIPAL

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay, Instituto de Biotecnología, UNAM
Dra. Susana López Charreton, Instituto de Biotecnología, UNAM**

Cuernavaca, Morelos. Abril, 2022



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.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera. Este trabajo se realizó gracias al apoyo de PAPIIT-UNAM proyectos IT200521 e IT200418, IV200420, IV200820, AMEXCID-SRE y SECTEI. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de una beca de maestría otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT (CVU: 925591).

DEDICATORIA

A mi madre, por todo su apoyo en las buenas, en las malas y en las peores, porque cuando las cosas van mal solo nos tenemos los unos a los otros. Por ser un superhéroe para mí.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora la Dra. Laura Palomares, por la oportunidad de ingresar a su grupo y aprender de ella, del grupo de investigación y de mí mismo en esta experiencia, por su empatía, pero también por su exigencia, por escuchar una mente siempre hambrienta de más y recordarle con paciencia que “cuesta mucho educar a un hombre, pero cuesta más no hacerlo”.

Al Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez por el voto de confianza y la oportunidad de poder realizar este trabajo en el grupo Palomares-Ramírez.

A los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Susana López y la Dra. Yvonne Rosenstein, por las importantes recomendaciones durante la realización de este proyecto.

Al Dr. Tomás López, el Dr. Juan Ludert, la Dra. Vanessa López, el Dr. Baltazar Becerril y la Dra. Laura Cobos, por haber aceptado formar parte de mi jurado, tomarse el tiempo necesario para revisar este trabajo, por sus valiosas recomendaciones para fomentar la autocrítica, mejorar el presente trabajo escrito y por las amenas conversaciones sobre el fascinante mundo de la inmunología, los anticuerpos y los virus.

A la M.C Martha Contreras, por su apoyo constante en el trabajo diario del laboratorio y brindarnos frecuentemente las condiciones para poder realizar el trabajo de cultivo celular.

A la M.C Ana Ruth Pastor, por todo su apoyo e instrucción en el sistema baculovirus-células de insecto, por su exigencia y su empatía, pero sobre todo por su sinceridad.

A la M.C Vanessa Hernández y al Ing. Alberto Porras Sanjuanico, por instruirme y por todo su apoyo en la determinación de los perfiles de glicosilación.

Al “team Zika” M.C. Arturo Liñán, M.C Juan Carlos Rivera y M.C. Esmeralda Cuevas, por todo su apoyo técnico, consejo, amistad y compañía cuando los días haciendo experimentos se vuelven noches y las noches se vuelven a hacer días.

A la Dra. Michelle Gutiérrez “team todo” y al LCG Enrique Paz, por todo su apoyo y mentoría para realizar la parte de biología molecular.

A la Dra. Roberta Salinas y a la M.C. Jocelyn Uribe por el apoyo recibido en experimentos que las circunstancias nos impidieron incluir en este trabajo.

Al personal del Laboratorio Nacional de Producción y Análisis de Moléculas y Medicamentos Biotecnológicos (LAMMB), en especial a la Dra. Mabel Rodríguez, por las facilidades para que se realizase la determinación del perfil de glicosilación en sus instalaciones.

A Larisa Campos por su apoyo administrativo.

A la unidad de síntesis y secuenciación del IBT por el servicio de síntesis de oligos.

A los amigos de la generación y del grupo Palomares-Ramírez que me han acompañado en esta etapa.

A Andrés, Alex, Gabriel, Debra, Ali, Aldito, Jey, Arely, Bere, Elena, Naye, Esme y Paz, por no dejarme solo en uno de los peores momentos de mi vida, la lealtad convierte a los amigos en familia.

INDICE GENERAL

	Pag
Índice de figuras	VII
Índice de tablas	IX
Lista de abreviaturas	X
Resumen	1
1. Introducción	2
1.1 El género <i>Flavivirus</i>	2
1.2 Ciclo de replicación de los <i>Flavivirus</i> y estructura del virión	2
1.3 Estructura de la proteína E	4
1.4 Las infecciones con los virus del Dengue y Zika	4
1.5 Amplificación mediada por anticuerpos (ADE)	5
1.6 Los epítomos del dímero de la proteína de envoltura (EDE)	7
1.7 Estructura de los anticuerpos y su función efectora	8
1.8 N-glicosilación de los anticuerpos y sistemas de expresión heteróloga	9
2. Antecedentes	10
2.1 ADE y N-glicosilación	10
2.2 El sistema baculovirus células de insecto (BEVS)	11
3. Hipótesis	12
4. Objetivo general	12
5. Objetivos particulares	12
6. Materiales y métodos	12
6.1 Expresión del anticuerpo en células de mamífero	12
6.1.1 Expresión del anticuerpo EDE1C8 en cultivo de células CHO	12
6.1.2 Purificación del anticuerpo EDE1C8 expresado en células CHO	12
6.1.3 Cuantificación del anticuerpo EDE1C8	13
6.2 Determinación del patrón de N-glicosilación del anticuerpo EDE1C8 expresado en células CHO	13
6.3 Estrategia de clonación de las secuencias de las cadenas del anticuerpo EDE1C8 en el vector pFastBacDual y experimentos <i>in silico</i>	13
6.4 Clonación de las secuencias de las cadenas del anticuerpo y construcción de plásmidos donadores	16
6.4.1 Extracción de ADN plasmídico y análisis del patrón de restricción del vector pCHO-EDE1C8	16
6.4.2 Transformación, extracción y análisis del patrón de restricción del vector pFastBacDual	16
6.4.3 Amplificación de la secuencia cadena ligera del anticuerpo EDE1C8	17
6.4.4 Clonación de la secuencia de la cadena ligera del anticuerpo EDE1C8 en el vector pFastBacDual	17
6.4.5 Amplificación y clonación de la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo EDE1C8 en el vector pFastBacDual	18

6.5 Transformación de células DH10Bac y análisis del b́acmido recombinante en las colonias transformadas con el pĺasmido donador	21
6.6 Extracci3n del b́acmido recombinante bacEDE1C8	23
6.7 Transfecci3n de c3lulas de insecto con el b́acmido recombinante y expresi3n del anticuerpo en las c3lulas transfectadas	24
6.8 Purificaci3n de placa del baculovirus recombinante BacEDE1C8	24
6.9 Titulaci3n del baculovirus recombinante BacEDE1C8	25
6.10 Producci3n del anticuerpo EDE1C8 en c3lulas de insecto	26
6.11 Purificaci3n y determinaci3n del patr3n de N-glicosilaci3n del anticuerpo EDE1C8 expresado en c3lulas de insecto	26
6.12 Evaluaci3n de la funcionalidad del anticuerpo expresado en c3lulas de insecto	27
7. Resultados y discusiones	29
7.1 Expresi3n del anticuerpo EDE1C8 en c3lulas CHO	29
7.2 Determinaci3n del patr3n de N-glicosilaci3n del anticuerpo EDE1C8 expresado en c3lulas CHO	30
7.3 Clonaci3n de las secuencias de las cadenas del anticuerpo y construcci3n de pĺasmidos donadores	31
7.3.1 Análisis del patr3n de digesti3n del vector pCHO-EDE1C8	31
7.3.2 Análisis del patr3n de restricci3n del vector pFastBacDual	32
7.3.3 Amplificaci3n de la secuencia de la cadena ligera del anticuerpo EDE1C8	33
7.3.4 Clonaci3n de la secuencia de la cadena ligera del anticuerpo en el vector pFastBacDual	33
7.3.5 Amplificaci3n y clonaci3n de la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo en el vector pFastBacDual	35
7.4 Transformaci3n de c3lulas DH10Bac y análisis del b́acmido recombinante en las colonias transformadas con el pĺasmido donador	37
7.5 Transfecci3n de c3lulas de insecto con el b́acmido recombinante y expresi3n del anticuerpo en las c3lulas transfectadas	38
7.6 Purificaci3n de placa del baculovirus recombinante BacEDE1C8	39
7.7 Titulaci3n del baculovirus recombinante BacEDE1C8 y producci3n del anticuerpo EDE1C8 en c3lulas de insecto	41
7.8 Evaluaci3n de la funcionalidad del anticuerpo EDE1C8 expresado con el sistema baculovirus-c3lulas de insecto	43
7.9 Determinaci3n del patr3n de N-glicosilaci3n del anticuerpo EDE1C8 expresado en c3lulas de insecto	44
8. Conclusiones	49
9. Perspectivas	49
10. Referencias	50

11. Anexos	54
Anexo I. Mapas de restricción de las secuencias del anticuerpo EDE1C8	54
Anexo II. Mapas de los vectores utilizados	55
Anexo III. Evaluación de la presencia de la glicoproteína GP64 del baculovirus en el anticuerpo purificado de células de insecto mediante Western blot	56

1. Índice de figuras

	Pág.
Figura 1. Organización del genoma y ciclo de replicación de los <i>Flavivirus</i>	3
Figura 2. Estructura de la glicoproteína E	4
Figura 3. Mecanismo de fusión de los <i>Flavivirus</i> y fenómeno de amplificación mediada por anticuerpos o ADE	6
Figura 4. Variabilidad de la proteína E y epítomos EDE	8
Figura 5. Estructura general de un anticuerpo	9
Figura 6. Principales glicanos encontrados en la porción Fc de anticuerpos producidos en sistemas de expresión de mamífero, planta e insecto	10
Figura 7. Clonación <i>in silico</i> de la secuencia de la cadena ligera y construcción del plásmido pFBD-EDE1C8-Light	15
Figura 8. Estrategias de clonación <i>in silico</i> de la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo en el vector pFastBacDual	15
Figura 9. Cinética de crecimiento de las células CHO-S-EDE1C8 productoras de anticuerpo	29
Figura 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% del proceso de purificación con proteína A del anticuerpo EDE1C8 expresado en células CHO	30
Figura 11. Patrón de N-glicosilación del anticuerpo EDE1C8 expresado en células CHO	30
Figura 12. Análisis del patrón de digestión del vector Freedom pCHO-EDE1C8	31
Figura 13. Análisis del patrón de digestión del vector pFastBacDual	32
Figura 14. Amplificación de la secuencia de la cadena ligera del anticuerpo EDE1C8	33
Figura 15. Geles del proceso de clonación de la secuencia de la cadena ligera del anticuerpo EDE1C8 en el vector pFastBacDual	34
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de las reacciones de PCR de colonia para la cadena ligera	35
Figura 17. Amplificación de la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo EDE1C8 utilizando PCR de gradiente de temperatura	35
Figura 18. Digestión y purificación de banda del vector pFastBacDual con la secuencia de la cadena ligera	36
Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa de las reacciones de PCR de las colonias transformadas con la reacción de ligación con la cadena pesada del anticuerpo	36
Figura 20. Análisis del bácmido recombinante bacEDE1C8	38

	Pag
Figura 21. Expresión del anticuerpo EDE1C8 en las células transfectadas con el bÁcrido recombinante	39
Figura 22. Purificación de placa y expresión del anticuerpo a partir de placa viral	41
Figura 23. Titulación del baculovirus BacEDE1C8	42
Figura 24. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% del proceso de purificación con proteína A del anticuerpo EDE1C8 expresado en células de insecto de la línea Sf9	43
Figura 25. Titulación de la cepa MR766 del virus del Zika mediante ensayo en placa en células Vero	44
Figura 26. Evaluación de la capacidad de reconocimiento del anticuerpo EDE1C8 expresado con el sistema baculovirus-células de insecto	44
Figura 27. Cromatograma de la determinación del patrón de N-glicosilación del anticuerpo EDE1C8 expresado en células de la línea Sf9	45
Figura 28. Relación de los glicanos de la porción Fc de los anticuerpos con la afinidad por los diferentes receptores Fc γ	47
Figura 29. Expresión de receptores Fc γ en las líneas celulares utilizadas para evaluar el fenómeno ADE y relación de los glicanos de la porción Fc con la afinidad por los receptores Fc γ	47

Índice de tablas

Pág.

Tabla 1. Mezcla de reacción para la amplificación por la reacción de PCR de la secuencia de la cadena ligera del anticuerpo EDE1C8	17
Tabla 2. Condiciones del programa de reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación de la secuencia de la cadena ligera del anticuerpo EDE1C8	17
Tabla 3. Mezcla de reacción para la amplificación de la secuencia de la cadena ligera por la reacción de PCR de colonia bacteriana	18
Tabla 4. Condiciones para la amplificación de la secuencia de la cadena ligera por PCR de colonia	18
Tabla 5. Mezcla de reacción para la amplificación de la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo por la reacción de PCR para la estrategia de 2 baculovirus	19
Tabla 6. Condiciones para la amplificación de la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo por PCR para la estrategia de 2 baculovirus	19
Tabla 7. Mezcla de reacción para la amplificación de la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo por la reacción de PCR para la estrategia de 1 baculovirus	19
Tabla 8. Condiciones para la amplificación de la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo por PCR para la estrategia de 1 baculovirus	20
Tabla 9. Condiciones de la mezcla de reacción de PCR a partir de colonia para la amplificación de la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo	20
Tabla 10. Condiciones para la amplificación de la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo a partir de PCR de colonia	21
Tabla 11. Condiciones de la mezcla de reacción para la amplificación del casete de transposición completo, flanqueado por los <i>primers</i> M13 a partir de colonia bacteriana ...	22
Tabla 12. Programa para la amplificación del casete de transposición completo, flanqueado por los <i>primers</i> M13 a partir de colonia bacteriana	22
Tabla 13. Condiciones de la mezcla de reacción para la amplificación de la región entre el bÁcmido y la cadena pesada del anticuerpo	22
Tabla 14. Programa para la amplificación de la región entre el bÁcmido y la cadena pesada	22
Tabla 15. Condiciones de la mezcla de reacción para la amplificación de la región entre el bÁcmido y la cadena ligera del anticuerpo	23
Tabla 16. Programa para la amplificación de la región entre el bÁcmido y la cadena ligera del anticuerpo	23
Tabla 17. Patrón de N-glicosilación del anticuerpo EDE1C8 expresado en células Sf9	45

Lista de abreviaturas

2-AB	2-aminobenzamida
ADCC	citotoxicidad dependiente de anticuerpos
ADCP	fagocitosis mediada por anticuerpos
ADE	Antibody Dependent Enhancement (amplificación mediada por anticuerpos)
BEVS	Baculovirus Expression Vector System
C1q	componente de complemento 1q
CDC	citotoxicidad dependiente de complemento
CH2	dominio constante 2 de la región constante de la cadena pesada
CHO	Chinese Hamster Ovary
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercelular adhesión molecule-3-Grabing Non-integrin
DENV	virus del Dengue
DHF/DSS	dengue hemorrhagic fever, dengue shock syndrome (dengue hemorrágico y choque por dengue)
DI DII DIII	dominios I, II y III
DMSO	dimetilsulfóxido
DVPS	Dengue vascular permeability syndrome
EDE	Envelope Dimer Epitope (epítipo del dímero de la proteína de envoltura)
Fab	Fragment antigen-binding (porción de unión al antígeno)
Fc	Fragment crystallizable (porción cristalizable)
FcγR	receptores Fcγ
FLE	Fusion loop epitope (epitope del bucle de fusión)
FPLC	cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
HRP	peroxidasa del rabano
Hsp	heat shock protein (proteína de choque térmico)
IgG	Inmunoglobulina G
JEV	virus de la encefalitis japonesa
kb	kilobases
kDa	kilodaltones
kpb	kilopares de bases
LB	Luria-Bertani
L-SIGN	liver/lymph node-specific ICAM-3-grabbing non-integrin
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad
MOI	multiplicidad de infección
MTT	bromuro 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2-5difenil tetrazolio
NS	proteína no estructural
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases

PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PNGasa F	Péptido-N-glicosidasa F
polH	poliedrina
PVDF	fluoruro de polivinilideno
RdRp	ARN polimerasa dependiente de ARN
RNA	ribonucleic acid (ácido ribonucleico)
RPM	revoluciones por minuto
SFB	suero fetal bovino
ssRNA	ARN monocatenario
TAM	Tyro3-Axl and Mer tyrosine kinases
TIM	T-cell immunoglobulin and mucin domain (dominios inmunoglobulina y mucina)
Tm	temperatura de alineamiento
TBEV	virus de la encefalitis transmitida por garrapatas
UFP	unidades formadoras de placa
VC	volúmenes de columna
WNV	virus del oeste del Nilo
YFV	virus de la fiebre amarilla
ZIKV	virus del Zika

RESUMEN

Las epidemias ocasionadas por los virus del Dengue y Zika han representado un problema de salud pública en los últimos años. Aunque la mayoría de las infecciones con estos virus se presentan en forma de fiebres moderadas de carácter autolimitante, la forma severa de la enfermedad ocasionada por la infección con el virus del Dengue, conocida como dengue hemorrágico, involucra un síndrome de permeabilidad vascular que pone en riesgo la vida de los pacientes y la infección con el virus del Zika se ha asociado al síndrome de Guillain-Barré y al nacimiento de niños con microcefalia. Debido a la importancia sanitaria de estos virus es importante disponer de alternativas terapéuticas y profilácticas, tales como el uso de anticuerpos que limiten la infección. Sin embargo, los *Flavivirus* son capaces de replicarse en células del sistema mononuclear fagocítico a través del fenómeno de amplificación mediada por anticuerpos, lo que puede contribuir a la severidad de las formas clínicas. Se ha reportado que los anticuerpos dirigidos a epítomos del dímero de la proteína de envoltura (EDE) poseen una alta capacidad para reconocer y neutralizar ambos virus. Los baculovirus han sido utilizados como un sistema de expresión de una gran variedad de proteínas recombinantes en células de insecto, incluyendo a algunos anticuerpos. Adicionalmente, en la expresión de un anticuerpo con actividad neutralizante contra el virus del Dengue, realizada en sistemas vegetales con un patrón de N-glicosilación que guarda semejanzas estructurales al presentado por células de insecto, se ha observado la ausencia del fenómeno de amplificación mediada por anticuerpos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad del sistema baculovirus-células de insecto para expresar adecuadamente un anticuerpo dirigido hacia un epítomo del dímero de la proteína de envoltura. Para cumplir con este objetivo, se realizó la producción y purificación del anticuerpo EDE1C8 a partir del cultivo de células CHO recombinantes. El plásmido empleado en la transfección de estas células productoras de anticuerpo fue usado para amplificar las secuencias que codifican para las cadenas ligera y pesada del anticuerpo. Los productos de la amplificación fueron insertados en el vector pFastBacDual para generar un plásmido donador que fue incorporado a células de *E. coli* DH10Bac para la generación de un bÁcmido recombinante. Este bÁcmido recombinante fue extraído y usado en la transfección de células Sf9 para generar el baculovirus recombinante. La expresión de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo en las células transfectadas fue confirmada por medio de la técnica de Western blot y el baculovirus recombinante con las secuencias codificantes para las cadenas del anticuerpo fue amplificado, titulado y usado en la infección de cultivos de células Sf9 para la producción del anticuerpo. El anticuerpo expresado fue purificado mediante cromatografía de afinidad en una columna con proteína A-sefarosa. Por último, se evaluó la funcionalidad del anticuerpo a través de su capacidad de reconocimiento de una cepa de referencia del virus del Zika y se hizo una comparación del patrón de N-glicosilación del anticuerpo expresado en células CHO y Sf9. Nuestros resultados muestran que el sistema baculovirus-células de insecto permite expresar adecuadamente el anticuerpo EDE1C8, el cual mantiene su capacidad de reconocer al virus del Zika y posee un patrón de N-glicosilación típico de las proteínas expresadas en células de insecto, diferente al presente en el anticuerpo producido en células de mamífero.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El género *Flavivirus*

La familia *Flaviviridae* está formada por 4 géneros: *Hepacivirus*, *Pegivirus*, *Pestivirus* y *Flavivirus*. Con más de 70 miembros diferentes, el género *Flavivirus* es el de mayor tamaño y sus miembros representan un problema de salud pública a nivel mundial. Entre algunos de los de mayor relevancia se encuentran los virus del Dengue (DENV), Zika (ZIKV), fiebre amarilla (YFV), el virus del oeste del Nilo (WNV), el virus de la encefalitis japonesa (JEV) y el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV). Su principal forma de transmisión es a través de vectores, dividiéndose en *Flavivirus* transmitidos por mosquitos y aquellos transmitidos por garrapatas. Con excepción del género de mosquitos *Culex*, que cuenta con una distribución ubicua y es asociado al virus del oeste del Nilo, los mosquitos del género *Aedes* son los principales responsables de la transmisión de los *Flavivirus*. Debido a que la presencia del mosquito vector es el principal factor de riesgo, las infecciones por estos virus se han considerado propias de regiones tropicales y subtropicales, afectando a la población que habita estas zonas o a turistas que las visitan. Sin embargo, debido a un incremento en la distribución de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* derivada del cambio climático, algunos modelos estiman que en algunos años la mayoría de los países podrán encontrarse en riesgo de infección durante al menos un mes del año (Ryan et al. 2019, Pagani et al. 2020). Adicionalmente, puede haber contribución de los géneros de mosquitos *Anopheles* y *Mansonia* en su transmisión (Vorou 2016).

1.2 Ciclo de replicación de los *Flavivirus* y estructura del virión

Los *Flavivirus* son virus envueltos con simetría icosaédrica y un genoma de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva (ssRNA+) de 11kb, con un solo gen policistrónico que codifica para una poliproteína que es procesada por proteasas celulares y virales en 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) y 3 proteínas estructurales. Las 3 proteínas que conforman la estructura del virión son la proteína C (cápside) y 2 glicoproteínas: la proteína E (envoltura) y la proteína precursora de la proteína de membrana (prM), que es la forma inmadura de la proteína M (membrana) (Chambers et al. 1990, Wang A et al. 2017). La entrada de los virus a las células se da mediante endocitosis mediada por receptores (Hackett & Cherry 2018). Han sido propuestas diversas proteínas como posibles receptores de los *Flavivirus* incluyendo a las integrinas $\alpha\beta3$, DC-SIGN, L-SIGN, Hsp70/90 y CD14; sin embargo, los candidatos más aceptados actualmente corresponden a las proteínas de las familias TIM (transmembrane immunoglobulin and mucin domain) y TAM (Tyro3 AXL Mer), atribuyendo a la capacidad de reconocimiento de fosfatidilserina por las proteínas de estas familias la capacidad para unirse en la envoltura viral a este fosfolípido y facilitar el proceso de endocitosis a través de un fenómeno de mímica apoptótica (Laureti et al. 2018, Flipse et al. 2013, Hamel et al. 2015, Cruz-Oliveira et al. 2015, Lee & Shin 2019, Pokidysheva et al. 2006, Amara & Mercer 2015). Una vez que los viriones son endocitados, los cambios de pH en el interior del endosoma conducen una serie de cambios conformacionales que llevan a la fusión de la envoltura viral con la membrana del endosoma, al proceso de decapsidación y a la liberación del material genético al citoplasma. Debido a la polaridad positiva del genoma viral, éste puede iniciar directamente el proceso de traducción de la poliproteína con las proteínas estructurales, seguidas por las proteínas no estructurales, que participan en la evasión de la respuesta inmune innata celular y durante la formación de los complejos de replicación, incluyendo a la proteína NS5 que posee actividad ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) y es

responsable de la replicación del genoma. Durante la mayor parte del ciclo viral la proteína de la cápside permanece en el citoplasma, pero en su extremo carboxilo esta contiene una señal hidrofóbica que funge como péptido señal para la translocación al retículo endoplásmico de la proteína prM, que a su vez sirve como una chaperona que asiste en el correcto plegamiento de la proteína E. El ensamblaje viral ocurre por gemación de las proteínas prM y E hacia el interior del retículo endoplásmico arrastrando consigo la cápside asociada con el genoma viral. Los viriones resultantes ensamblados en el lumen del retículo endoplásmico despliegan en su superficie 180 copias de cada una de las glicoproteínas agrupadas en forma de 60 trímeros del heterodímero prM/E dándoles una apariencia “espinosa” y corresponden a virus inmaduros que carecen de capacidad infecciosa. Estas partículas virales inmaduras son transportadas a través del sistema Trans-Golgi en el cual el pH ácido induce cambios conformacionales que dan lugar a la reorganización de la proteína E en 90 dímeros y que exponen el sitio de corte para la furina, una proteasa residente del aparato de Golgi, responsable de realizar la escisión del fragmento pr de la proteína prM. Sin embargo, con el pH ácido del aparato de Golgi, este fragmento permanece unido al virión cubriendo el *loop* de fusión e impidiendo la unión prematura de la envoltura viral con el compartimento celular. Una vez que la progenie viral es liberada por exocitosis al pH neutro del medio extracelular la afinidad del fragmento pr disminuye, desprendiéndose de la superficie del virión y dando lugar a la superficie lisa con 90 dímeros de la proteína E de los viriones maduros, que son completamente infecciosos y capaces de unirse a otra célula para generar un nuevo ciclo de replicación (Figura 1) (Chambers et al. 1990, Mukhopadhyay et al. 2005, Hasan et al. 2018). En la arquitectura icosaédrica de estos viriones los dímeros se encuentran distribuidos en 60 unidades asimétricas, cada una representando la mitad de 30 balsas en forma de espiga con 3 dímeros de la proteína E y resultando en una disposición cuasisimétrica de los dímeros en la superficie del virión en 2, 3 o 5 ejes de simetría.

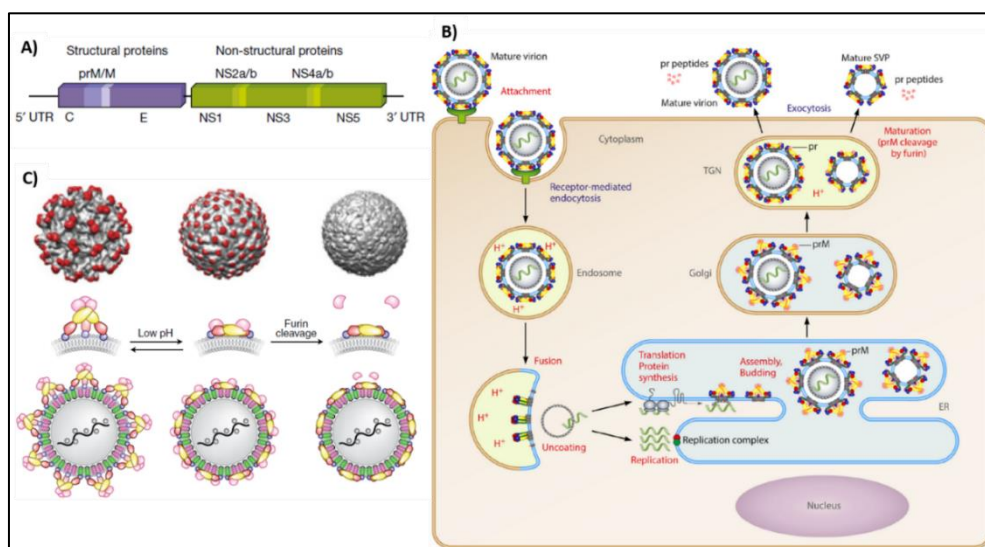


Figura 1. Organización del genoma y ciclo de replicación de los *Flavivirus*. A) Localización de las proteínas estructurales (morado) y no estructurales (verde) en el genoma viral. B) Representación esquemática del ciclo de replicación de los *Flavivirus* con sus diferentes pasos. C) Representación esquemática (parte media e inferior) y en imágenes de criomicroscopía electrónica (parte superior) de la estructura de los viriones inmaduros recién formados en el retículo endoplásmico (izquierda), de los viriones inmaduros bajo las condiciones ácidas del aparato de Golgi (en medio) y de los viriones maduros liberados al espacio extracelular (derecha). C, proteína de la cápside; prM proteína precursora de la proteína de membrana (M); E, proteína de envoltura. Modificado de Heinz FX & Stiasny K. (2017). The antigenic structure of zika virus and its relation to other flaviviruses: implications for infection and immunoprophylaxis. y Slon-Campos JL, et al. (2018). The immune response against Flaviviruses.

1.3 Estructura de la proteína E

La proteína E en la superficie de los viriones maduros es responsable de la unión con el receptor celular que precede al proceso de endocitosis, así como, de llevar a cabo la fusión de la envoltura viral con la membrana del endosoma. La estructura de la proteína expuesta en la superficie del virión está compuesta por 3 dominios: un dominio en forma de barril B en el extremo amino (DI o dominio I), un dominio extendido de dimerización (DII o dominio II) en cuyo extremo se ubica el bucle o *loop* de fusión y un dominio tipo inmunoglobulina (DIII o dominio III) que participa en la unión al receptor celular (Kostyuchenko et al. 2016, Sirohi et al. 2016). En el virus del Zika y la mayoría de los *Flavivirus* esta proteína es modificada postraduccionalmente por un proceso de N-glicosilación en el residuo de asparagina 154 (N154) del DI y en el caso del virus del Dengue en los residuos 67 (DII) y 153 (DIII) (Figura 2) (Fontes-Garfias et al. 2017, Carbaugh & Lazear. 2020).

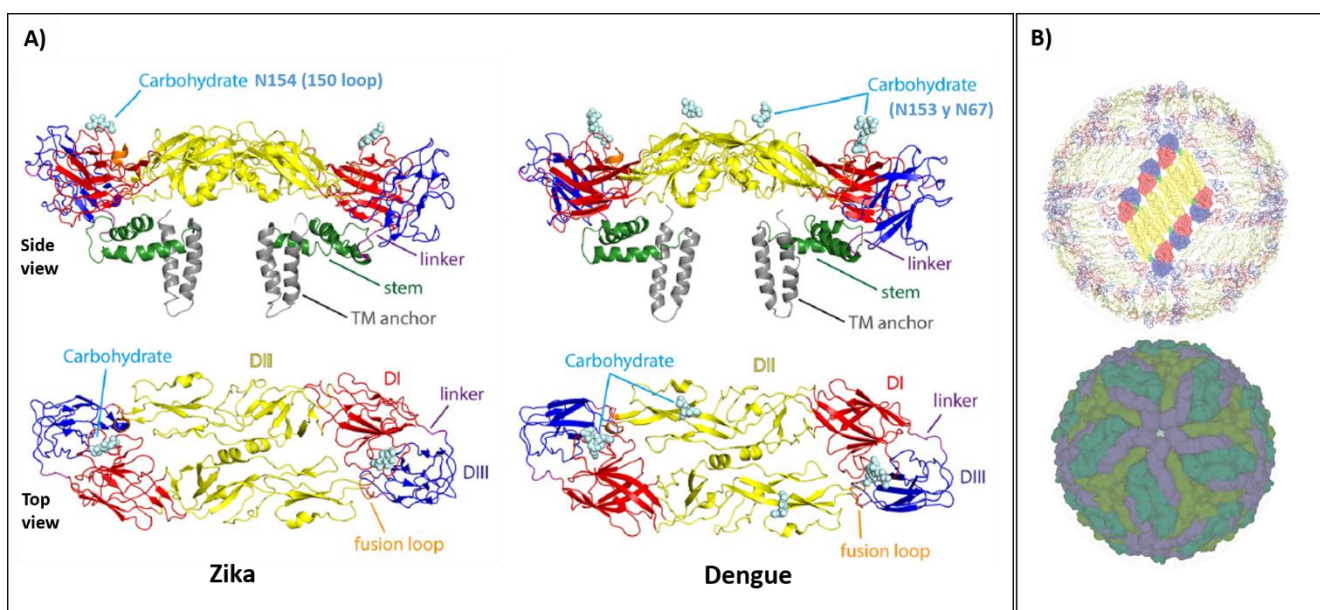


Figura 2. Estructura de la glicoproteína E. A) Vista lateral y superior de la proteína E del virus del Zika (izquierda) y Dengue (derecha) con sus 3 ectodominios representados en rojo (DI), amarillo (DII) y azul (DIII); también se representan el loop de fusión (naranja) y los carbohidratos (esferas azules) presentes en los sitios de N-glicosilación. B) representación de la proteína E en la superficie del virión. En la parte superior se muestra la proteína E con su arquitectura y dominios representados del mismo modo que en el panel A. En la parte inferior (PDB: 5IRE) se ilustra la orientación en 2, 3 y 5 ejes de simetría de los dímeros de la proteína E en la superficie del virión. Modificado de Heinz FX & Stiasny K. (2017). The antigenic structure of zika virus and its relation to other flaviviruses: implications for infection and immunoprophylaxis y Mukhopadhyay S, et al. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle.

1.4 Las infecciones con los virus del Dengue y Zika

Las infecciones causadas por los *Flavivirus* suelen ser asintomáticas o de un carácter febril moderado y autolimitante; sin embargo, existen formas severas de la enfermedad. En el caso de la infección con el virus del Dengue, esta presentación conocida como dengue hemorrágico o DHF/DSS (dengue hemorrhagic fever, dengue shock syndrome) tiene como mecanismo subyacente un síndrome de permeabilidad vascular (DVPS) caracterizado por trombocitopenia, incremento en la permeabilidad vascular y pérdida de líquido a terceros espacios (intersticio y cavidades serosas), con la subsecuente hemoconcentración, disminución de la presión de pulso, hipotensión, choque y la muerte de los pacientes, que puede estar acompañada de un incremento en la concentración sanguínea de enzimas hepáticas y hemorragias gastrointestinales (Halstead et al. 2010, Halstead 2014).

Por su parte, desde la epidemia causada por el virus del Zika en Brasil durante finales de 2015 y principios de 2016, se observó un incremento en la severidad y espectro de manifestaciones clínicas ocasionadas por el virus, principalmente de carácter neurológico, incluyendo encefalitis, meningoencefalitis, mielitis, neuropatía sensorial y óptica, por su replicación en neuronas periféricas, convulsiones, así como el síndrome de Guillain-Barre y un síndrome congénito asociado al virus caracterizado principalmente por el nacimiento de los infantes con microcefalia (Pierson & Diamond 2018, Medina & Medina-Montoya 2017). También se observó la transmisión sexual del virus y su replicación en tejidos privilegiados inmunológicamente, como cerebro, retina y testículos (Pierson & Diamond 2018, Lee & Shin 2019).

1.5 Amplificación mediada por anticuerpos (ADE)

El virus del Dengue se clasifica en 4 serotipos (DENV1 a DENV4). Generalmente es aceptado que la infección con cualquiera de los 4 serotipos confiere inmunidad de por vida ante una posible reinfección con el mismo serotipo. Por el contrario, las formas severas con el síndrome de permeabilidad vascular son observadas con mayor frecuencia en casos de reinfecciones con un serotipo distinto (infecciones secundarias heterotópicas) (Bardina et al. 2017, Wahala & de Silva 2011, Halstead 2014) o durante la primoinfección de infantes nacidos de madres con inmunidad frente al virus del Dengue que adquirieron anticuerpos contra el virus de manera pasiva mediante transferencia materna (Guzman et al. 2013, Kliks et al. 1988, Halstead 2002, Simmons et al. 2007, Chau et al. 2009). Esta situación no se presenta en todos los casos de reinfecciones o de primera exposición de infantes procedentes de madres seropositivas, ya que después de una infección se observa un periodo refractario a la enfermedad de 3 meses, seguido de un periodo de protección parcial de 2 años (Halstead 2014) y en el caso de infantes se asocia con la caída de anticuerpos neutralizantes a los 6 meses de edad (Chau et al. 2009), sin embargo, muestra la preexistencia de anticuerpos como un posible factor de riesgo para el desarrollo de formas severas de enfermedad.

Una de las principales teorías para explicar los cuadros de mayor severidad con el síndrome de permeabilidad vascular en condiciones bajo las cuales hay preexistencia de anticuerpos capaces de reconocer al virus ha sido a través de una mayor viremia favorecida por el fenómeno de amplificación mediada por anticuerpos o ADE (Halstead 2014, Halstead 2019). Este fenómeno, ilustrado en la figura 3, describe un incremento en la entrada y replicación viral favorecido por la presencia de anticuerpos a través de la formación de complejos inmunes infecciosos que facilitan la interacción con células que expresan receptores para la fracción Fc. Estos complejos con capacidad infecciosa son el resultado de la unión de los virus con anticuerpos no neutralizantes (Figura 3, inciso B) o con bajas concentraciones de anticuerpos neutralizantes (Figura 3, inciso A) (Tirado & Yoon 2003, Taylor et al. 2015, Khandia et al. 2018, Pierson et al. 2007, Dowd & Pierson 2011). Una característica de los *Flavivirus* es su capacidad de infectar y replicarse en células del sistema mononuclear fagocítico (Jessie et al. 2004, Aye et al. 2014, Gollins & Porterfield 1985, Durbin et al. 2008, Michlmayr et al. 2017), facilitada por el mecanismo de fusión de su proteína de envoltura cuyos cambios conformacionales son conducidos en su totalidad por la acidificación del pH durante la maduración del endosoma. Estos cambios involucran una serie de pasos que incluyen la separación del dímero de la proteína E y la exposición del *loop* de fusión con la posterior inserción de este elemento hidrofóbico en la membrana del endosoma, la reorganización de los dominios de la proteína y la fusión de la envoltura viral con el endosoma (Stiasny et al. 2011,

Heinz & Stiasny. 2017). Debido a esto, la formación de complejos inmunes con anticuerpos que permiten la interacción con células fagocíticas sin evitar los cambios que llevan a la fusión de la envoltura viral puede favorecer la infección de las células con un mayor número de virus (Tirado & Yoon 2003, Heinz & Stiasny. 2017, Rey et al. 2018).

En el caso del virus del Dengue, este fenómeno se ha observado en líneas celulares (Guy et al. 2004, Huang et al. 2005, Puerta-Guardo et al. 2010, Puerta-Guardo et al. 2013, Boonnak et al. 2013, Ayala-Nunez et al. 2016), cultivos primarios (Halstead et al. 1980, Boonnak et al. 2008, Boonnak et al. 2011) y en primates no humanos (Halstead 1979, Goncalvez et al. 2007). Sin embargo, desde su primera descripción existe evidencia de que puede ser mediado por reactividad cruzada entre distintos *Flavivirus* (Hawkes 1964) incluyendo evidencia en monos Rhesus de que puede presentarse entre los virus del Dengue y Zika (George et al. 2017), y ha sido demostrado experimentalmente entre estos 2 *Flavivirus* en modelos de cultivo celular a través del uso de suero completo, anticuerpos purificados del suero y anticuerpos monoclonales (Bardina et al. 2017, Priyamvada et al. 2016, Dejnirattisai et al. 2016, Stettler et al. 2016). Y como consecuencia de que desde la epidemia de 2015 y 2016 en Brasil, los brotes causados por el virus del Zika se presentasen en zonas endémicas del virus del Dengue, la amplificación del virus del Zika mediada por anticuerpos dirigidos a epítomos comunes entre estos *Flavivirus* a través del fenómeno ADE fue propuesta como teoría para explicar el mecanismo responsable del incremento de severidad en las manifestaciones clínicas asociadas al virus del Zika (Bardina et al. 2017).

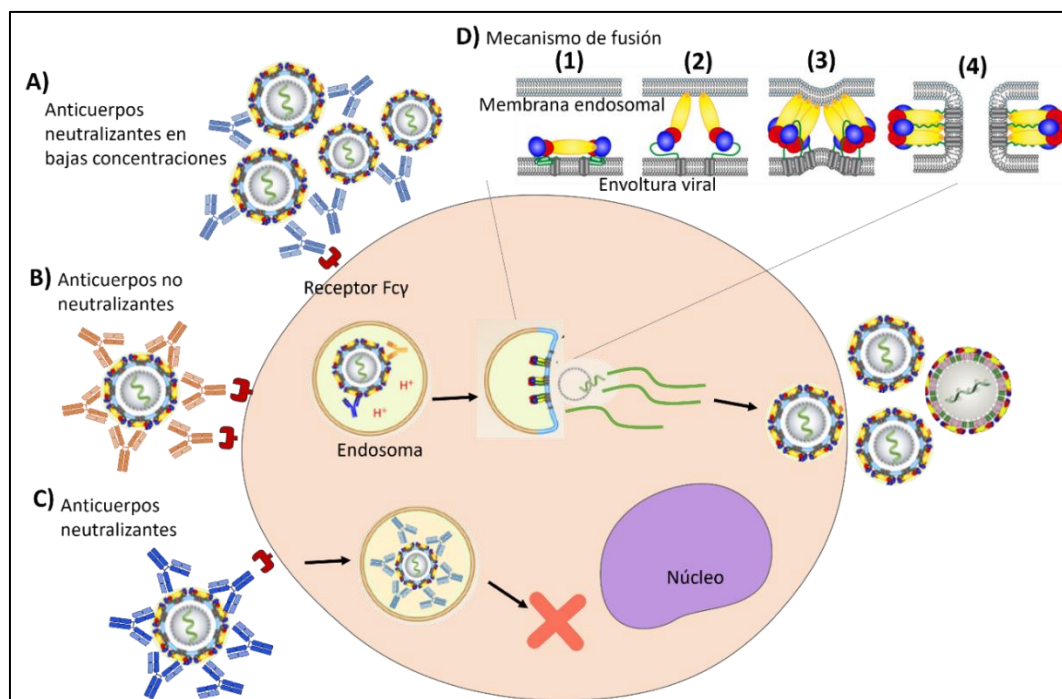


Figura 3. Mecanismo de fusión de los *Flavivirus* y fenómeno de amplificación mediada por anticuerpos o ADE. A) Complejos inmunes infecciosos formados con bajas concentraciones de anticuerpos neutralizantes. B) Amplificación mediada por anticuerpos llevada a cabo por la formación de complejos inmunes infecciosos con anticuerpos no neutralizantes. C) Neutralización viral por anticuerpos neutralizantes. D) Cambios conformacionales en la proteína E presentados como parte del mecanismo de fusión de los *Flavivirus*. 1) Separación del dímero de la proteína E. 2) Exposición del *loop* de fusión y su inserción en la membrana del endosoma. 3) Reorganización del dominio III. 4) Fusión con la membrana endosomal y liberación del genoma viral al citoplasma. En rojo se representa el dominio I, amarillo el dominio II y azul el dominio III. Adaptado de Heinz FX & Stiasny K. (2017). The antigenic structure of zika virus and its relation to other flaviviruses: implications for infection and immunoprophylaxis.

1.6 Los epítomos del dímero de la proteína de envoltura (EDE)

La glicoproteína E es la proteína inmunodominante de los *Flavivirus*. Aunque entre los diferentes miembros del género, esta proteína conserva sus 3 dominios y su arquitectura presenta una alta variabilidad en los residuos de aminoácidos que son desplegados en la superficie del virión (Rey et al. 2018, Heinz & Stiasny. 2017). Como consecuencia de esta variación entre *Flavivirus* y de la resultante dentro de aislados de una misma cepa por la formación de cuasiespecies (Domingo et al. 2000, Pierson & Diamond 2016), la formación de superficies en el virión compartidas entre diferentes virus que pueda dar lugar a epítomos comunes y a la producción de anticuerpos dirigidos a estos epítomos es limitada, como se ilustra en la figura 4. No obstante, existen estructuras altamente conservadas, como el *loop* de fusión del dominio II, localizado en un bolsillo hidrofóbico constituido por los dominios I y III de la proteína adyacente en el dímero, hacia las cuales se producen anticuerpos (Dejnirattisai et al. 2015). De manera similar, se han identificado regiones conservadas entre los virus del Dengue y Zika en la superficie del virión próxima al bolsillo del *loop* de fusión formadas por la interfaz entre las 2 proteínas de un dímero que dan lugar a los epítomos del dímero de la proteína de envoltura o EDE (por sus siglas en inglés, envelope dimer epitope) (Dejnirattisai et al. 2016, Dussupt et al. 2021, Rey et al. 2018).

Los epítomos del dímero de la proteína de envoltura se identificaron a partir del mapeo de epítomos en partículas subvirales de DENV de un panel de anticuerpos monoclonales generado a partir de un paciente convaleciente (Dejnirattisai et al. 2015). Las bases estructurales de la actividad neutralizante de los anticuerpos dirigidos hacia estos epítomos han sido estudiadas para el virus del Dengue (Rouvinski et al. 2015) y Zika (Barba-Spaeth et al. 2016), y pese a que pueden mediar ADE en ambos virus en concentraciones subóptimas, se ha observado una alta capacidad neutralizante frente a los 4 serotipos del virus del Dengue y frente al virus del Zika en comparación con los anticuerpos dirigidos a epítomos del *loop* de fusión (FLE), incluyendo la capacidad de inhibir *in vitro* el efecto ADE del virus del Zika inducido por el suero proveniente de pacientes que presentaron una infección con el virus del Dengue (Dejnirattisai et al. 2016), por lo que representan una opción terapéutica frente a los virus del Dengue y Zika. El potencial terapéutico de algunos de estos anticuerpos como el EDE1C8 y el EDE1B10 ha sido explorado en modelos murinos, observándose la capacidad de conferir un efecto protector, aunque de corta duración (Fernández et al. 2017).

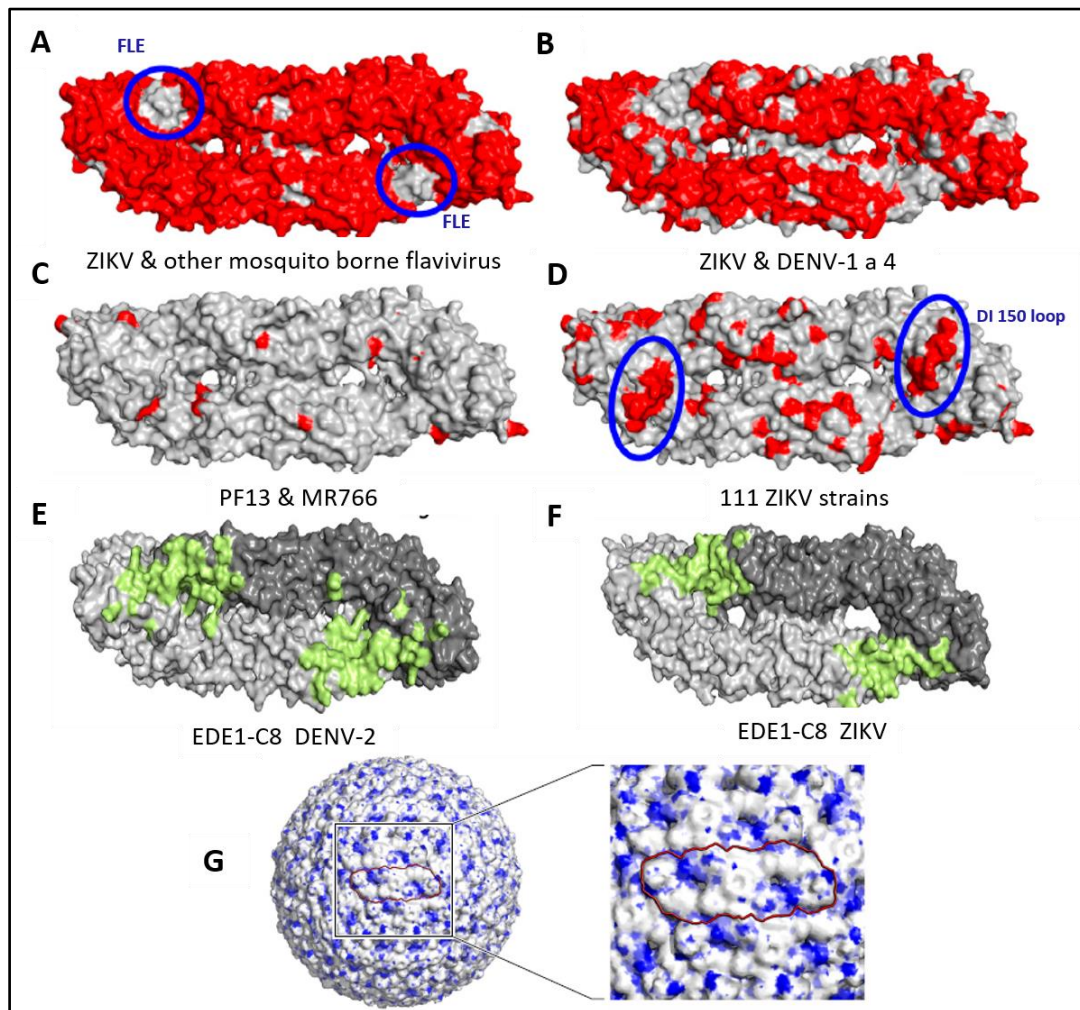


Figura 4. Variabilidad de la proteína E y epítomos EDE. A, B, C y D: alineamientos estructurales de la proteína E dimérica ilustrando los aminoácidos que difieren (rojo) entre el virus del Zika y los otros *Flavivirus* transmitidos por mosquitos (A), el virus del Zika y los 4 serotipos del virus del Dengue (B), las 2 cepas tipo del linaje asiático y africano del virus del Zika (C) o entre las 111 cepas del virus del Zika (D) reportadas en la base de datos ViPR (Virus Pathogen Resource). E y F: sitio de unión (verde) del anticuerpo EDE1C8 en el dímero de la proteína E de los virus del Dengue (E) y Zika (F). G: Aminoácidos más conservados (azul) en la superficie del virión de los *Flavivirus*. Adaptado de: Heinz FX & Stiasny K. (2017). The antigenic structure of zika virus and its relation to other flaviviruses: implications for infection and immunoprophylaxis. y Rey FA, et al. (2018). The bright and the dark side of human antibody responses to flaviviruses: lessons for vaccine design.

1.7 Estructura de los anticuerpos y su función efectora

Los anticuerpos son proteínas que están formadas por 4 cadenas peptídicas unidas por puentes disulfuro: 2 cadenas pesadas y 2 cadenas ligeras. El amino terminal de una cadena pesada y una cadena ligera forman la porción de unión al antígeno o Fab. En el extremo contrario, la parte carboxilo terminal de las 2 cadenas pesadas forma la porción cristalizable o Fc, que posee un sitio conservado de glicosilación ubicado en el residuo de asparagina 297 del dominio constante 2 de cada una de las cadenas pesadas de una IgG (Figura 5) (Cymer et al. 2017). El efecto protector de los anticuerpos es mediado, por un lado, en virtud de su habilidad de unirse directamente a los virus y neutralizar su capacidad de infectar células susceptibles y, por otro lado, en función de su habilidad de inducir la activación de funciones efectoras coordinadas a través la región Fc y su unión a C1q o a los receptores para la porción Fc (FcγR) (Patel et al. 2019). Estas comprenden la activación del complemento por la vía clásica (CDC), la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) y la opsonización con la subsecuente fagocitosis y producción de mediadores inflamatorios (ADCP) (Patel et al. 2019, Mora &

Rosales 2009) y pueden ser moduladas por la composición del oligosacárido unido en la porción Fc (Raju 2008, Cymer et al. 2017, Jiang et al. 2011, Jefferis 2012). Algunos ejemplos de los residuos que pueden formar parte de este glicano y que se han relacionado a cambios en la función efectora de los anticuerpos son la galactosa, el ácido siálico y la fucosa. Los residuos de galactosa terminales se han asociado a un incremento en la unión a los receptores Fc γ , al ácido siálico se le atribuye un efecto antiinflamatorio y en el caso de la fucosa, su eliminación está asociada a un incremento en la afinidad por los receptores Fc γ RIIA y Fc γ RIIIb (Raju 2008, Cymer et al. 2017, Reusch & Tejada 2015).

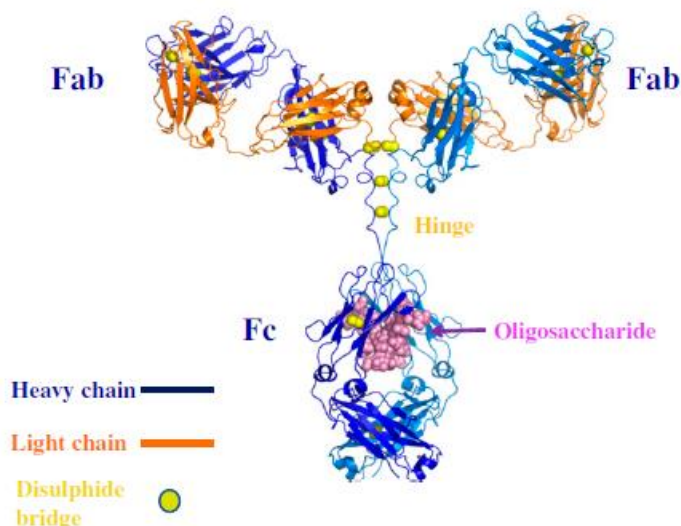


Figura 5 Estructura general de un anticuerpo. Tomado de Jefferis. (2012). Isotype and glycoform selection for antibody therapeutics. Arch Biochem Biophys. 526(2):159-166.

1.8 N-glicosilación de los anticuerpos y sistemas de expresión heteróloga

En los anticuerpos producidos en células de mamífero los patrones de N-glicosilación están constituidos predominantemente por glicanos de tipo complejo y biantenarios que pueden tener residuos terminales de galactosa en los 2 brazos, en uno solo o carecer de galactosa (conocidos como formas G2, G1 o G0). Por su parte, en el caso de la expresión heteróloga en la planta de tabaco se observan de manera predominante glicanos de tipo complejo con un residuo de xilosa unido a la manosa central conectada al núcleo de quitobiosa y un residuo de fucosa unido en posición $\alpha(1-3)$ directamente al residuo de N-acetilglucosamina más interno, como se encuentra representado en la figura 6 (Chen 2016).

En el caso de la N-glicosilación en células de insectos, son de mayor abundancia los glicanos con residuos de manosas terminales, debido a la actividad hexosaminidasa en el aparato de Golgi. El oligosacárido es sustrato de N-acetilglucosaminidasas que remueven residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) terminales, resultando en estructuras del tipo paucimanosas. Estas formas paucimanosídicas son estructuras sencillas formada por 3 o menos residuos de manosa unidos a un núcleo de quitobiosa (Palomares et al. 2018, Geisler et al. 2015) y constituyen el tipo de glicano más abundante en las glicoproteínas producidas por células de insectos.

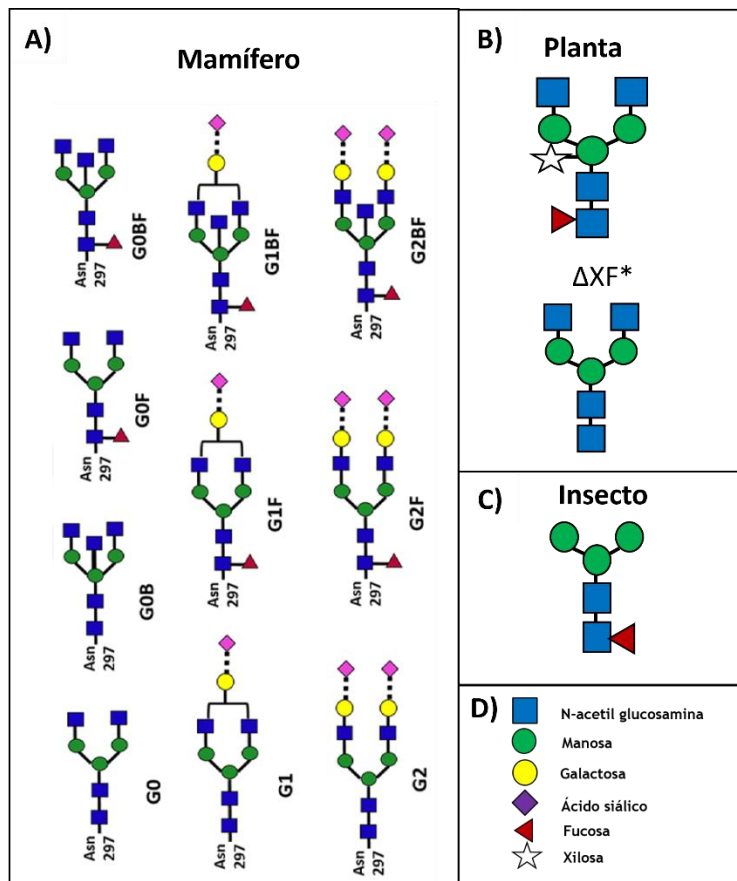


Figura 6. Principales glicanos encontrados en la porción Fc de anticuerpos producidos en sistemas de expresión de mamífero, planta e insecto. A) Principales formas de glicanos encontradas en anticuerpos expresados en células de mamífero B) Imagen superior: principal glicano encontrado en anticuerpos expresados en el sistema de *Nicotiana benthamiana*. * = glicano más abundante encontrado en anticuerpos expresados en una línea de *Nicotiana benthamiana* desarrollada para evitar la adición de residuos de carbohidratos con potencial alergénico. C) Representación de una forma paucimanosídica, las cuales constituyen el tipo de glicano más abundante en las glicoproteínas expresadas en células de insecto. D) Clave de acotaciones usada para ilustrar los residuos de carbohidratos en los paneles A, B y C. Las representaciones esquemáticas fueron adaptadas a partir de los artículos: Wang Q et al. (2018), Dent M, et al. (2016), Chen Q (2016), Viswanathan & Betenbaugh (2005), Palomares, et al. (2018) y Betenbaugh, et al. (2004).

2. ANTECEDENTES

2.1 ADE y N-glicosilación

La amplificación mediada por anticuerpos es un fenómeno complejo en el que participan factores asociados a los virus, los anticuerpos y la señalización a través de los receptores Fcγ; el cual puede presentarse como parte de la fisiopatología en las infecciones con *Flavivirus* y que debe tenerse presente en el desarrollo de vacunas y terapias antivirales basadas en anticuerpos. A pesar de la complejidad del fenómeno y de poderse presentar con anticuerpos neutralizantes, Dent y colaboradores observaron que el anticuerpo E60, un anticuerpo monoclonal con la capacidad de neutralizar los 4 serotipos del virus del Dengue, pero la desventaja de mediar ADE, mostró la ausencia del fenómeno sin la pérdida de actividad neutralizante cuando el anticuerpo fue producido con un patrón de N-glicosilación distinto al de células CHO (del inglés Chinese hamster ovary) mediante su expresión en la planta de tabaco (*Nicotiana benthamiana*) tanto con su patrón de N-glicosilación nativo como con el presentado a través de la expresión en una línea vegetal estable desarrollada para evitar la adición de residuos de xilosa y fucosa (Dent et al. 2016).

2.2 El sistema baculovirus células de insecto (BEVS)

Los baculovirus son virus envueltos con forma de bastón y un genoma de ADN bicatenario circular de 80 a 180 Kpb (Rohrmann 2019, Haase et al. 2013). Debido a que son virus específicos de artrópodos, son utilizados ampliamente como un vector para la expresión de proteínas recombinantes en células de insecto (Kollewe & Vilcinskas 2013, Palomares et al. 2015). El sistema baculovirus-células de insecto posee múltiples ventajas como son su capacidad de escindir péptidos señales de mamífero y realizar modificaciones postraduccionales como la N-glicosilación, altos niveles de expresión, escalabilidad y seguridad, debido a su especificidad por artrópodos (Palomares et al. 2015, Kollewe & Vilcinskas 2013).

Los baculovirus han sido utilizados en la expresión de diversas proteínas complejas incluyendo receptores acoplados a proteínas G (Mahesh et al. 2018), moléculas del MHC (Jordan et al. 2008, Kozono et al. 1994) proteínas quiméricas (Hilton 2015), despliegue de mimótopos y proteínas virales (Crawford et al. 2004, Wang Y et al. 2005, Zhou et al. 2017, Chen et al. 2020, Luo et al. 2020), producción de partículas pseudovirales (Palomares et al. 2015) y varios anticuerpos (Hasemann & Capra 1990, zu Putlitz et al. 1990, Hsu et al. 1994, Edelman et al. 1997, Johansson et al. 2007, Hsu et al. 1997, Liang et al. 1997, Park et al. 2009, Tada et al. 2015, Bantleon et al. 2016).

En nuestro grupo de trabajo se realizó la generación de unas células CHO recombinantes productoras del anticuerpo EDE1C8. Estas células se obtuvieron como parte del trabajo de doctorado de Cuevas-Juárez, tras la transfección de células de la línea CHO-S con una construcción del plásmido Freedom pCHO[®], en la cual se clonaron las secuencias codificantes de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo (VL y VH), obtenidas a partir de las secuencias reportadas por Barba-Spaeth y colaboradores (Barba-Spaeth et al. 2016), fusionadas a las secuencias de las regiones constantes de las cadenas humanas kappa y gamma 1, respectivamente.

Por las razones previamente expuestas, el sistema baculovirus-células de insecto puede representar una excelente opción para la expresión de anticuerpos de interés biomédico en el estudio de la inmunopatología de los *Flavivirus* y desarrollo de posibles candidatos terapéuticos, tales como los anticuerpos dirigidos a epítomos del dímero de la proteína de envoltura. Por lo tanto, el presente trabajo tuvo por objetivo realizar la producción de un anticuerpo dirigido a un epítomo del dímero de la proteína de envoltura utilizando el sistema baculovirus-células de insecto.

3. HIPOTESIS

El sistema baculovirus-células de insecto permite expresar de manera correcta un anticuerpo que reconoce un epítipo del dímero de la proteína de envoltura de los *Flavivirus*, con un patrón de N-glicosilación característico de las proteínas producidas en células de insecto.

4. OBJETIVO GENERAL

Expresar y caracterizar a través del sistema baculovirus-células de insecto el anticuerpo EDE1C8, el cual reconoce un epítipo presente en los dímeros de la proteína E de los *Flavivirus* del Dengue y Zika.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

5.1 Expresar el anticuerpo EDE1C8 en células CHO y determinar su patrón de N-glicosilación.

5.2 Construir un plásmido donador y generar un baculovirus recombinante que permita expresar las cadenas ligera y pesada del anticuerpo EDE1C8.

5.3 Infectar células de insecto con el baculovirus recombinante, evaluar la expresión del anticuerpo EDE1C8, confirmar que reconoce a su epítipo y determinar su patrón de N-glicosilación.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Expresión del anticuerpo en células de mamífero

6.1.1 Expresión del anticuerpo EDE1C8 en cultivo de células CHO

La producción del anticuerpo en células CHO se realizó a partir del cultivo de células CHO-S EDE1-C8, que corresponden a las células desarrolladas por Cuevas-Juárez. El anticuerpo se produjo mediante un cultivo en lote con un volumen de 300 ml de medio CellVento CHO200 suplementado con L-glutamina a una concentración final de 6 mM y se tomaron muestras diariamente durante el tiempo de cultivo, para determinar la concentración celular a través de un contador electrónico de partículas (Coulter Multisizer II, Beckman Coulter) y su viabilidad a partir de su tinción con azul de tripán y cuantificación en un hematocitómetro.

El cultivo fue detenido al observarse el decremento en la viabilidad, se clarificó la suspensión celular a 2500 rpm durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante en condiciones de esterilidad y se almacenó a 4°C hasta su proceso de purificación.

6.1.2 Purificación del anticuerpo EDE1C8 expresado en células CHO

La purificación del anticuerpo se hizo mediante cromatografía de afinidad con proteína A. La muestra clarificada del cultivo de células CHO-S EDE1-C8 y filtrada a través de una membrada de 0.45µm fue procesada por FPLC a en un sistema cromatográfico Akta prime (GE) a través de una columna preempacada de 5ml (Eshmun MiniChrom, Merck Millipore). Para esto, se equilibró la columna con una cantidad de buffer de equilibrio (Na_2HPO_4 17.32mM, KH_2PO_4 2.7mM, KCl 2.9mM, NaCl 0.4M, pH 7.0) equivalente a 6 volúmenes de columna, se realizó una sola inyección de 280ml de la muestra a un flujo de 2ml por minuto y se reservó la fracción no unida a la columna. Después de realizar un lavado

con 5 volúmenes de columna se eluyó el anticuerpo con buffer de elución (Glicina-HCl 0.1M, pH 3.1) a un flujo de 2ml por minuto y finalmente se neutralizó el pH de la fracción eluída.

La fracción eluída y neutralizada se dializó usando una membrana con un límite de corte de peso molecular de 6 a 8 kDa (SpectraPor) en buffer fosfatos a una relación 1:400. El proceso de diálisis de la muestra se realizó en agitación a 4°C durante 24h, tiempo después del cual se esterilizó por filtración a través de una membrana de 0.2µm y se almacenó en alícuotas a una temperatura de -20°C para su posterior uso.

6.1.3 Cuantificación del anticuerpo EDE1C8

La concentración del anticuerpo recuperado se determinó mediante un espectrofotómetro NanoDrop 100 (Thermo Scientific) utilizando un programa precargado en el software del equipo que contempla la absorbancia de la muestra a 280 nm y el coeficiente de extinción molar de una IgG ($13.7\%^{-1}\text{cm}^{-1}$) en la ecuación de la ley de Lambert-Beer para determinar la concentración de IgG presente en la muestra.

6.2 Determinación del patrón de N-glicosilación del anticuerpo EDE1C8 expresado en células CHO

El patrón de N-glicosilación del anticuerpo EDE1C8 producido en células CHO se determinó mediante cromatografía de interacción hidrofílica de fase normal (HILIC). Para esto, se realizó la digestión del glicano de la porción Fc presente en 100µg de muestra de anticuerpo purificado con la enzima PNGasaF de *Elizabethkingia meningosepticum* (Calbiochem) durante 15 horas a 37°C y se recuperaron los glicanos mediante su filtración a través de un cartucho de ultrafiltración con límite de peso molecular de 30 kDa (Corning). Los glicanos recuperados fueron concentrados a sequedad en un concentrador Savant y se derivatizaron con 2-aminobenzamida (2-AB) incubándolos durante 2 horas a 65°C. Las muestras con los glicanos marcados se congelaron 10 minutos a -20°C y se colocaron en cartuchos de vidrio con papel filtro Whatman No1 dejándolos absorber 15 minutos. Posteriormente, se lavaron con 1ml de acetonitrilo al 100% y 5 ml de acetonitrilo al 96%, y se realizó la elución de los glicanos con 4 lavados de 0.5ml de agua ultrapura. Los glicanos eluídos se procesaron en un concentrador Savant, se resuspendieron a un volumen de 100µl en agua ultrapura y se mezclaron 10µl con 40µl de acetonitrilo al 100% para inyectarse a un sistema cromatográfico (Alliance Bio 2796) y separarse por HPLC con un tiempo de corrida de 180 minutos en función de su carácter hidrofílico a través de una columna Amido-80 con un gradiente de formato de amonio, comparándose con una curva de calibración de unidades de glucosa (Dextran Ladder, Sigma Aldrich) para transformar los tiempos de retención en unidades de glucosa y determinar las estructuras de los glicanos.

6.3 Estrategia de clonación de las secuencias de las cadenas del anticuerpo EDE1C8 en el vector pFastBacDual y experimentos *in silico*.

Para la generación del baculovirus recombinante y la expresión del anticuerpo EDE1C8 en células de insecto se utilizó el vector pFastBacDual del sistema Bac to Bac (Invitrogen), esta modalidad del sistema baculovirus requiere previamente de la obtención de un báculo recombinante generado mediante la transposición sitio específica entre el báculo bMON14272 propagado en la cepa DH10Bac de *E. coli* y un vector plasmídico donador construido a partir de la inserción de los genes de interés (cadenas del anticuerpo) en un vector pFastBac.

Para poder llevar a cabo la construcción del plásmido donador, se utilizaron las secuencias de las cadenas del anticuerpo de la construcción del plásmido pCHO que se usó en la transfección y generación de las células CHO-S-EDE1-C8 del trabajo de Cuevas-Juárez y se seleccionaron los sitios de restricción de las enzimas BamHI y HindIII para realizar la clonación de la secuencia de la cadena ligera en el sitio de clonación múltiple (MCS) bajo el control del promotor del gen de la poliedrina (polH) en el vector pFastBacDual. A continuación, se procedió a realizar el diseño de los *primers forward y reverse* (Figura 7) y se realizó *in silico* la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación de la secuencia de la cadena ligera, la digestión del fragmento de PCR y su inserción en el vector usando el programa SnapGene para generar el plásmido pFBD-EDE1C8-Light.

Una vez generada *in silico* la construcción con la cadena ligera (pFBD-EDE1C8-Light), se abordaron 2 estrategias de manera simultánea. La primera: amplificar la cadena pesada y realizar su inserción entre los sitios XhoI y KpnI en el MCS bajo el control del promotor P10, con esta estrategia de 1 baculovirus, el resultado es un plásmido donador con las secuencias de las 2 cadenas del anticuerpo, a partir del cual, es posible generar un solo baculovirus que permita expresar la cadena ligera y pesada bajo el control de los promotores polH y P10, respectivamente. Y la segunda estrategia: digerir la construcción pFBD-Light-EDE1C8-Light con las enzimas BamHI y HindIII para reemplazar la secuencia codificante de la cadena ligera del anticuerpo por la secuencia de la cadena pesada y obtener así 2 plásmidos donadores y 2 baculovirus con los cuales expresar las 2 cadenas del anticuerpo bajo el control del promotor de la polihedrina al realizar una coinfección, por lo cual de denomino a esta opción como estrategia de 2 baculovirus. En la figura 8 se ilustran ambas estrategias de clonación, así como los *primers* diseñados.

Para el diseño de los pares de *primers* para cada una de las construcciones se añadió en el extremo 5', después del sitio de restricción correspondiente, el número de nucleótidos sugeridos por la tabla *Cleavage close to the end of DNA* (disponible en la página web de laboratorios NewEngland Biolabs) que permitiese el mejor anclaje y porcentaje de digestión. Y, por último, se verificó una baja probabilidad de formación de dímeros entre *primers*, así como de estructuras secundarias usando la herramienta *Oligoanalyzer* (dirección electrónica de IDT Integrated DNA Technologies) y se usó la herramienta *Tm calculator* (New England Biolabs) para calcular la temperatura de alineamiento. Una vez que se revisó que los sitios de corte para las enzimas de restricción seleccionadas no se encontrasen dentro de las secuencias de las cadenas del anticuerpo (mapas de restricción en el anexo I), se realizó *in silico* la ligación y se confirmó la ausencia de un corrimiento en el marco de lectura en las construcciones para, finalmente, solicitar la síntesis de los *primers* diseñados a la unidad de síntesis y secuenciación del instituto de biotecnología para proceder a realizar los experimentos correspondientes.

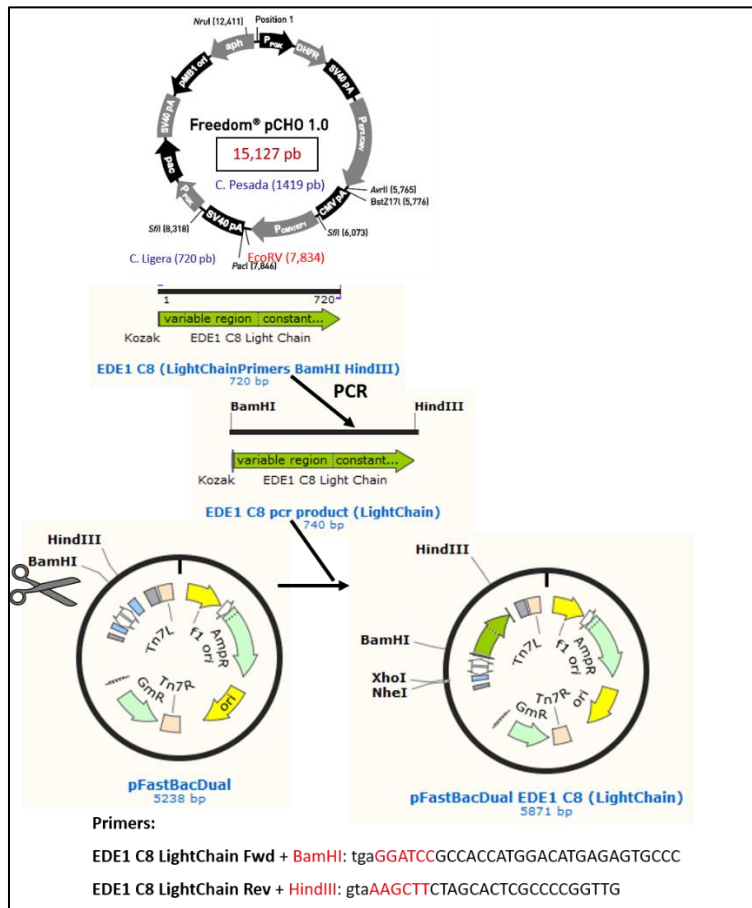


Figura 7. Clonación *in silico* de la secuencia de la cadena ligera y construcción del plásmido pFBD-EDE1C8-Light.

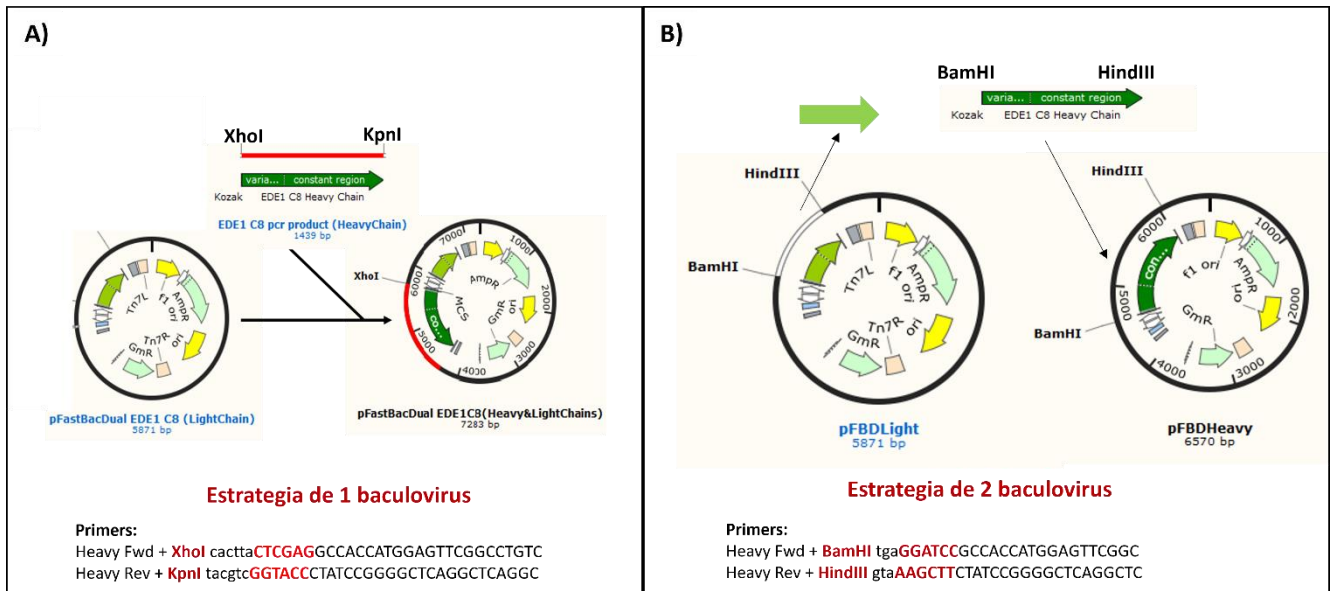


Figura 8. Estrategias de clonación *in silico* de la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo en el vector pFastBacDual. A) Clonación de la cadena pesada entre los sitios XhoI y KpnI del promotor P10 (estrategia de 1 baculovirus con los 2 promotores). B) Reemplazo de la cadena ligera por la cadena pesada entre los sitios BamHI y HindIII del promotor de poliedrina (estrategia de 2 baculovirus).

6.4 Clonación de las secuencias de las cadenas del anticuerpo y construcción de plásmidos donadores

6.4.1 Extracción de DNA plasmídico y análisis del patrón de restricción del vector pCHO-EDE1C8

Para realizar la extracción del plásmido con las secuencias de las cadenas del anticuerpo a partir de la cepa de *E. coli* en la que fue propagado, se realizó la siembra por estría cruzada de la cepa TOP10 con la construcción en una placa de medio LB con kanamicina (sulfato de kanamicina, 50µg/µl) y se seleccionaron 3 colonias a las cuales se realizó el cultivo líquido en agitación (290rpm) durante 16h a 37°C en 5ml de medio LB con kanamicina. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron (14,000 rpm, 5 minutos) y se resuspendieron en 500µl de agua para realizar la extracción del pDNA por columna (Zippy plasmid miniprep kit; Zymo Research), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN extraído se eluyó en un volumen de 44µl de agua libre de DNAsas y se cuantificó a partir de su absorbancia a 260nm (NanoDrop 1000; Thermo Scientific). Una vez cuantificado, se empleó el DNA para su análisis de restricción y la amplificación de las cadenas del anticuerpo, para confirmar la presencia de la construcción con las secuencias del anticuerpo EDE1C8.

Para el análisis de restricción de cada colonia se usaron las enzimas en las siguientes combinaciones: I) EcoRV, II) EcoRV + KpnI y III) NheI, además de incluir el vector sin digerir como control negativo. Las digestiones de 200ng cada una, se llevaron a cabo en un volumen de 20µl de acuerdo con las recomendaciones para cada enzima (New England Biolabs) incubándolas durante 6h a 37°C con 10 (KpnI y NheI) o 20 (EcoRV) unidades por reacción. El análisis de las digestiones se realizó con 50ng de cada condición en un gel de agarosa al 1%.

6.4.2 Transformación, extracción y análisis del patrón de digestión del vector pFastBacDual

Para propagar el vector pFastBacDual, se realizó la transformación de células quimiocompetentes de la cepa TOP10 de *E. coli*. Las células se descongelaron en hielo durante 10 minutos y se incubaron con 1ng del vector pFastBacDual o los controles pFastBac y pFastBacDual GusCat durante 30 minutos. Después se sometieron a un choque térmico de 42°C durante 45 segundos y se dejaron recuperar con 1ml de medio LB durante 1h a 37°C en agitación (250rpm) antes de ser plaqueadas en agar LB con ampicilina (100µg/ml) e incubadas durante 24 horas. Posteriormente, se realizó el cultivo líquido (5ml de medio LB Ampicilina 100µg/ml), extracción (Zyppy Plasmid Miniprep kit) y cuantificación de pDNA (Nanodrop 1000 ThermoSc) de diversas colonias.

Las reacciones de digestión para el análisis de restricción se llevaron a cabo usando los vectores pFastBac, pFastBacDual y pFastBacDual GusCat con las combinaciones de enzimas HindIII, NheI y HindIII + EcoRV. Las digestiones de 500ng se realizaron durante 1 hora en un volumen final de 50µl, con base en las recomendaciones del fabricante (NewEngland Biolabs) y los productos se analizaron a través su electroforesis en un gel de agarosa.

6.4.3 Amplificación de la secuencia de la cadena ligera del anticuerpo EDE1C8

Para las reacciones de PCR, se utilizó la polimerasa Phusion High-Fidelity (MO530L, NewEngland Biolabs) y el plásmido con la construcción pCHO-EDE1C8 (3 colonias en total) como templado. Las condiciones de concentración de la mezcla de reacción, así como de temperatura y duración de los programas con las cuales se amplificó la cadena ligera del anticuerpo EDE1C8, se muestran en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Mezcla de reacción para la amplificación por la reacción de PCR de la secuencia de la cadena ligera del anticuerpo EDE1C8

Reactivo	C. final	Vol. por reacción de 25µl
H ₂ O	--	cbp 25µl
Buffer HF 5x	1x	5
DNTPs (10mM)	200µM	0.5µl
LightC Fwd (25pmol/µl)	0.5µM	0.5µl
LightC Rev (25pmol/µl)	0.5µM	0.5µl
Templado (pCHOEDE1C8)	1ng/25µl de Rx	1µl
Phusion HF DNAPol	0.5U/25µl de Rx	0.25µl

Tabla 2. Condiciones del programa de reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación de la secuencia de la cadena ligera del anticuerpo EDE1C8.

No. de paso	No. de repeticiones	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
1		Desnaturalización	98	30
2	35	Desnaturalización	98	7
		Alineamiento	58	12
		Extensión	72	25
3		Extensión	72	5min
4		Enfriamiento	4	

6.4.4 Clonación de la secuencia de la cadena ligera del anticuerpo EDE1C8 en el vector pFastBacDual

Una vez amplificada la cadena ligera del anticuerpo con los sitios para las enzimas BamHI y HindIII se analizó la actividad de estas enzimas en el vector pFastBacDual y se realizó la digestión simultánea con el fragmento de PCR de la cadena ligera para su inserción en el vector. Para esto, se realizaron las digestiones simultáneas, se incubó el vector durante media hora a 37°C con 10 unidades de la enzima CIP (alcalino fosfatasa del intestino de ternera, MO290 NewEngland Biolabs) y se realizó la limpieza del vector y el inserto a través de una columna comercial (DNA Clean & Concentrator kit, Zymo Research). Los productos limpios y cuantificados de las digestiones se usaron para preparar la reacción de ligación (T4 ligasa MO202S, NewEngland Biolabs) con 200ng del vector y 141ng (relación molar 1:10) en un volumen de 20µl, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, la cual se incubó durante 2 horas a 24°C y se utilizó para transformar células TOP10 quimiocompetentes. Durante la ligación y transformación se incluyeron reacciones sin ligasa y sin inserto a manera de controles. Una vez

formadas las colonias, se estrieron 60 de ellas y se realizó el análisis de 20 a través de una reacción de PCR usando una muestra de las colonias en agua libre de nucleasas como templado para la enzima Taq polimerasa. Aquellas colonias en las cuales se observó la presencia de un producto de tamaño compatible con la cadena ligera fueron crecidas en medio LB durante 16h y preservadas en glicerol. En las tablas 3 y 4 se muestran las condiciones de la mezcla de reacción y del programa utilizado para confirmar la presencia de la construcción con la secuencia de la cadena ligera en las colonias mediante PCR.

Tabla 3. Mezcla de reacción para la amplificación de la secuencia de la cadena ligera por la reacción de PCR de colonia bacteriana.

Reactivo	C. final	Vol. por reacción de 25µl
H ₂ O	--	cbp 25µl
Buffer Std 10x	1x	2.5
DNTPs (10mM)	200µM	0.5µl
LightC Fwd (25pmol/µl)	0.5µM	0.5µl
LightC Rev (25pmol/µl)	0.5µM	0.5µl
Templado (colonia)	X	10µl
Taq DNApol	1.5U/50µl de Rx	0.25µl

Tabla 4. Condiciones para la amplificación de la secuencia de la cadena ligera por PCR de colonia.

No. de paso	No. de repeticiones	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
1		Desnaturalización	95	5min
2	35	Desnaturalización	95	20
		Alineamiento	56	15
		Extensión	68	45
3		Extensión	68	5min
4		Enfriamiento	4	

6.4.5 Amplificación y clonación de la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo EDE1C8 en el vector pFastBacDual

Para llevar a cabo la clonación de la secuencia de la cadena pesada en el vector pFastBacDual con las 2 estrategias descritas previamente, se utilizaron los *primers* diseñados en una PCR de gradiente de temperatura. En las tablas 5 a 8 se muestran las condiciones de las reacciones de PCR para la amplificación de la cadena pesada con cada par de *primers*.

Tabla 5. Mezcla de reacción para la amplificación de la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo por la reacción de PCR para la estrategia de 2 baculovirus.

Reactivo	C. final	Vol. por reacción de 25µl
H ₂ O	--	cbp 25µl
Buffer Std 10x	1x	2.5
DNTPs (10mM)	200µM	0.5µl
HeavyFwd BamHI (25pmol/µl)	0.5µM	0.5µl
HeavyRev HindIII (25pmol/µl)	0.5µM	0.5µl
Templado (pCHO-EDE1C8)	0.5y1ng/25µl Rx	10µl
Phusion HF DNApol	1.5U/50µl de Rx	0.25µl

Tabla 6. Condiciones para la amplificación de la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo por PCR para la estrategia de 2 baculovirus.

No. de paso	No. de repeticiones	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
1		Desnaturalización	98	30
2	35	Desnaturalización	98	12
		Alineamiento	52-62	15
		Extensión	72	30
3		Extensión	72	5min
4		Enfriamiento	4	

Tabla 7. Mezcla de reacción para la amplificación de la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo por la reacción de PCR para la estrategia de 1 baculovirus.

Reactivo	C. final	Vol. por reacción de 25µl
H ₂ O	--	cbp 25µl
Buffer Std 10x	1x	2.5
DNTPs (10mM)	200µM	0.5µl
HavyFwd XhoI (25pmol/µl)	0.5µM	0.5µl
HeavyRev KpnI (25pmol/µl)	0.5µM	0.5µl
Templado (pCHO-EDE1C8)	0.5y1ng/25µl Rx	10µl
Phusion HF DNApol	1.5U/50µl de Rx	0.25µl

Tabla 8. Condiciones para la amplificación de la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo por PCR para la estrategia de 1 baculovirus.

No. de paso	No. de repeticiones	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
1		Desnaturalización	98	30
2	35	Desnaturalización	98	12
		Alineamiento	52-62	15
		Extensión	72	30
3		Extensión	72	5min
4		Enfriamiento	4	

Una vez amplificada la secuencia de la cadena pesada con los sitios para las enzimas BamHI y HindIII, para la estrategia de 2 baculovirus, o los sitios de las enzimas XhoI y KpnI para la estrategia de 1 baculovirus, se llevó a cabo la digestión de los fragmentos de PCR con las enzimas correspondientes a cada estrategia durante 2h a 37°C. Los productos resultantes de la digestión de los amplicones de la cadena pesada del anticuerpo y de la digestión y purificación de banda del vector pFBD-EDE1C8-Light (la construcción con la cadena ligera proveniente de la colonia 37) se limpiaron a través de una columna comercial (DNA Clean & Concentrator kit, Zymo research) y las biopartes limpias y cuantificadas se usaron para preparar reacciones de ligación con 500ng de pFBD-EDE1C8-light y 100ng del amplicón con los extremos cohesivos de XhoI y KpnI o 500ng de pFBD-EDE1C8-Light y 100ng del amplicón con los extremos cohesivos de BamHI y HindIII (relación molar 1:7) en un volumen de reacción de 20µl, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, las cuales se incubaron durante 2 horas a 24°C y se utilizaron para transformar células TOP10 quimiocompetentes. De las colonias transformantes resultantes se analizaron de 20 de cada estrategia mediante la técnica de PCR para confirmar la presencia de las construcciones con la secuencia de la cadena pesada. Una vez identificada la secuencia de la cadena pesada en colonias pertenecientes a ambas estrategias, se preservaron algunas colonias con la construcción pFBD-EDE1C8-Heavy (estrategia de 2 baculovirus) y la construcción pFBD-EDE1C8-L+H (estrategia de 1 baculovirus). En las tablas 9 y 10 se muestran las condiciones para la amplificación de la cadena pesada a partir de las colonias bacterianas.

Tabla 9. Condiciones de la mezcla de reacción de PCR a partir de colonia para la amplificación de la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo.

Reactivo	C. final	Vol. por reacción de 25µl
H ₂ O	--	cbp 25µl
Buffer Std 10x	1x	2.5µl
DNTPs (10mM)	200µM	0.5µl
HeavyC Fwd BamHI/XhoI (25pmol/µl)	0.5µM	0.5µl
HeavyC Rev HindIII/KpnI (25pmol/µl)	0.5µM	0.5µl
Templado (colonia)	X	10µl
Taq DNApol	0.5U/25µl de Rx	0.125µl

Tabla 10. Condiciones para la amplificación de la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo a partir de PCR de colonia.

No. de paso	No. de repeticiones	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
1		Desnaturalización	95	5min
2	35	Desnaturalización	95	20
		Alineamiento	52	20
		Extensión	68	90
3		Extensión	68	5min
4		Enfriamiento	4	

6.5 Transformación de células DH10Bac y análisis del báculo recombinante en las colonias transformadas con el plásmido donador.

Para realizar la transformación de la cepa DH10Bac de *E. coli*, que alberga el báculo bMON1472, la construcción con las secuencias de las cadenas del anticuerpo fue extraída del cultivo líquido de una de las colonias seleccionadas (Zippy plasmid miniprep kit) y se procedió con la transformación de la siguiente manera: se permitió descongelar las células DH10Bac durante 10min y se incubaron con 100ng de la construcción con las secuencias del anticuerpo en hielo durante 30 minutos, se realizó un choque térmico a 42°C por 45seg, seguido de 5 minutos de incubación en hielo y 4½ horas en 1ml de medio de recuperación a 37°C y agitación de 300 rpm. Las células se centrifugaron a 12,000rpm para eliminar el sobrenadante el cual se reemplazó por un volumen de 250µl de medio LB. Posteriormente, las células se sembraron en placas de agar LB con kanamicina (50µg/ml), gentamicina (7µg/ml) y tetraciclina (10µg/ml) cubiertas con 50µl de una mezcla de IPTG (50mg/ml) y Xgal (40mg/ml). Las placas se incubaron en posición invertida por 24h a 36°C y 24h adicionales a temperatura ambiente, inspeccionando en ambos periodos la formación de colonias blancas correspondientes a un fenotipo LacZ(-). Estas colonias fueron estriadas en una nueva placa para confirmar su fenotipo y disminuir la probabilidad de contaminación con células sin el báculo recombinante.

Previo a la extracción del báculo, se realizó el análisis de las colonias de *E. coli* DH10Bac con fenotipo LacZ negativo mediante la técnica de PCR para confirmar la presencia del báculo recombinante y la inserción del casete de transposición con las secuencias de las cadenas del anticuerpo en la orientación correcta, así como descartar las colonias contaminadas con báculos no recombinantes que puedan dar lugar a baculovirus capaces de competir e interferir con la expresión del anticuerpo en células de insecto. Para esto, se usó un par de *primers* dirigidos a secuencias del fago M13 ubicadas de manera externa a los dos sitios de inserción del casete de transposición en el báculo bMON1472, así como, la combinación de alguno de estos oligos con el *primer* Light Fwd utilizado en la amplificación de la cadena ligera, o el *primer* HeavyC Mid (AGGTGGACAAGAGGGTGGAGCCTA), que hibrida a la mitad de la secuencia de la cadena pesada. En las tablas 11 a 16 se muestran las condiciones y programas de PCR utilizados en el análisis de la inserción del casete de transposición.

Tabla 11. Condiciones de la mezcla de reacción para la amplificación del casete de transposición completo, flanqueado por los *primers* M13 a partir de colonia bacteriana.

Reactivo	C. final	Vol. por reacción de 25µl
H ₂ O	--	cbp 25µl
Buffer Std 10x	1x	2.5µl
DNTPs (10mM)	200µM	0.5µl
M13 Fwd	0.5µM	1.25µl
M13 Rev	0.5µM	1.25µl
Templado (colonia LacZ-)	X	10µl
Taq DNApol	0.5U/25µl de Rx	0.125µl

Tabla 12. Programa para la amplificación del casete de transposición completo, flanqueado por los *primers* M13 a partir de colonia bacteriana.

No. de paso	No. de repeticiones	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
1		Desnaturalización	95	5min
2	35	Desnaturalización	95	30
		Alineamiento	54	20
		Extensión	68	5min
3		Extensión	68	5min
4		Enfriamiento	4	

Tabla 13. Condiciones de la mezcla de reacción para la amplificación de la región entre el b́acmido y la cadena pesada del anticuerpo.

Reactivo	C. final	Vol. por reacción de 25µl
H ₂ O	--	cbp 25µl
Buffer Std 10x	1x	2.5µl
DNTPs (10mM)	200µM	0.5µl
M13 Fwd	0.5µM	1.25µl
HeavyF Middle (25pmol/µl)	0.5µM	0.5µl
Templado (colonia LacZ-)	X	10µl
Taq DNApol	0.5U/25µl de Rx	0.125µl

Tabla 14. Programa para la amplificación de la región entre el b́acmido y la cadena pesada.

No. de paso	No. de repeticiones	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
1		Desnaturalización	95	5min
2	35	Desnaturalización	95	30
		Alineamiento	57	20
		Extensión	68	160
3		Extensión	68	5min
4		Enfriamiento	4	

Tabla 15. Condiciones de la mezcla de reacción para la amplificación de la región entre el báculo y la cadena ligera del anticuerpo.

Reactivo	C. final	Vol. por reacción de 25µl
H ₂ O	--	cbp 25µl
Buffer Std 10x	1x	2.5µl
DNTPs (10mM)	200µM	0.5µl
Light Fwd (25pmol/µl)	0.5µM	0.5µl
M13 Rev	0.5µM	1.25µl
Templado (colonia LacZ-)	X	10µl
Taq DNApol	0.5U/25µl de Rx	0.125µl

Tabla 16. Programa para la amplificación de la región entre el báculo y la cadena ligera del anticuerpo.

No. de paso	No. de repeticiones	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
1		Desnaturalización	95	5min
2	35	Desnaturalización	95	30
		Alineamiento	52	20
		Extensión	68	90
3		Extensión	68	5min
4		Enfriamiento	4	

6.6 Extracción del báculo recombinante bacEDE1C8.

La extracción del báculo recombinante a partir de las colonias seleccionadas se realizó en condiciones de esterilidad mediante lisis alcalina (Qiagen Plasmid Midi Prep). Brevemente, se realizaron cultivos líquidos a partir de las colonias en 3ml de medio LB con 50µg/ml kanamicina, 7µg/ml gentamicina y 10µg/ml de tetraciclina durante 16°C, después de este tiempo se reservó 1ml para la preservación de las colonias con los báculos en glicerol y se centrifugaron 2ml del cultivo por 1 minuto a 13,000rpm, se removió el sobrenadante y se resuspendió el botón con las células en 300µl del buffer 1, se adicionaron 300µl del buffer 2 y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, se adicionaron 300µl del tercer buffer con una agitación manual gentil para permitir la formación de un precipitado con contenido proteico y DNA que se dejó incubar 10 minutos en hielo y se centrifugó 10 minutos a 13,000rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo con 800µl de isopropanol, se mezcló gentilmente por inversión y se incubó durante 20 minutos en hielo y por 16h a -20°C y se centrifugó a 13,000rpm durante 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con 500µl de etanol al 70%, inversión manual y centrifugación de 10 minutos a 13,000rpm. Se removió cuidadosamente el sobrenadante y se dejó secar el pellet 10 minutos dentro de una campana de flujo laminar, finalmente, se resuspendió el pellet en 40µl de agua libre de DNAsas y se realizó la cuantificación de DNA a partir de su absorbancia a 260nm (NanoDrop 1000; Thermo Scientific).

6.7 Transfección de células de insecto con el bÁcrido recombinante y expresi3n del anticuerpo en las c3lulas transfectadas

La transfecci3n se llev3 a cabo utilizando el bÁcrido recombinante de una de las colonias seleccionadas y la lÍnea celular Sf9. Para esto, se sembr3 cada pozo de una placa de cultivo de 6 pozos con 2ml de una diluci3n de c3lulas Sf9 en medio Grace a 7.5×10^5 c3lulas/ml, preparada a partir de un cultivo en suspensi3n (2.5×10^6 c3lulas/ml), y se dej3 incubar a 27°C durante 45min para permitir su adhesi3n y la formaci3n de una monocapa de c3lulas. Una vez confirmada la formaci3n de la monocapa al microscopio, se realiz3 cuidadosamente un lavado con 2ml de medio Grace fresco evitando perturbar la monocapa, se elimin3 nuevamente el sobrenadante y se adicion3 a cada pozo 800µl de la mezcla de transfecci3n (750 o 1500ng de bÁcrido/ 30µl de flyfectina/ 764µl medio Grace), previamente homogeneizada y dejada reposar 45 minutos para permitir la formaci3n de micelas, o con 800µl de medio utilizado como control negativo. Despu3s de 4 horas de incubaci3n a temperatura ambiente, en agitaci3n y protecci3n de la luz, se revis3 la placa al microscopio, se complet3 el volumen de sobrenadante de cada pozo a un volumen final de 3ml usando medio SF900II y se realiz3 la incubaci3n de la placa con c3lulas a 27°C.

96 horas posteriores a la transfecci3n de las c3lulas con el bÁcrido recombinante, los sobrenadantes fueron recuperados, almacenados a 4°C y sustituidos en cada pozo por 3ml de medio SF900II fresco agregados mediante goteo para evitar la perturbaci3n de la monocapa. Despu3s de un periodo de incubaci3n adicional de 96 horas a 27°C, se recuperaron nuevamente los sobrenadantes con los baculovirus y se resuspendieron las c3lulas en 250µl de medio por pipeteo.

El pellet resuspendido a partir de las c3lulas a las 192 horas post-transfecci3n y los sobrenadantes recolectados a las 96 y 192 horas post-transfecci3n fueron separados mediante SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10% y transferidos con 100V constantes durante 75 minutos a una membrana de PVDF para confirmar la expresi3n del anticuerpo mediante Western blot. La membrana se bloque3 con leche descremada al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBST y se incub3 con 13ml de anticuerpo anti-humano conjugado a peroxidasa (Anti-human HRP; Jackson 109-035-003) diluido 1:5000 en PBST a temperatura ambiente durante 90 minutos. Despu3s de realizar 3 lavados de 10 minutos con PBST, la membrana se revel3 por quimioluminiscencia con 850µl de la soluci3n de revelado con luminol (Immobilon forte WB HRP substrate) y se registr3 el resultado usando el sistema de adquisici3n de imÁgenes Chemidoc (BioRad).

6.8 Purificaci3n de placa del baculovirus recombinante BacEDE1C8

Previo a la purificaci3n de placa, 1 ml del sobrenadante recolectado a las 192 horas de las c3lulas transfectadas con 1500ng del bÁcrido se us3 para realizar la infecci3n de 30ml de un cultivo en suspensi3n de c3lulas Sf9 y amplificar el baculovirus. El cultivo infectado se cosech3 al observarse una disminuci3n en la viabilidad por debajo de 30%, se clarific3 a 2000rpm y 4°C durante 10 minutos, se suplement3 con 1% de suero fetal bovino (SFB) y se almacen3 a 4°C protegido de la luz.

Una vez clarificado, el sobrenadante de la amplificaci3n del virus en c3lulas Sf9 se utiliz3 para realizar un ensayo en placa y la purificaci3n del baculovirus a partir de una placa del mismo. Para esto, se prepar3 1 placa de cultivo de 6 pozos con 2ml por pozo de una suspensi3n de c3lulas Sf9 en medio Grace's a una densidad de 5×10^5 c3lulas/ml que se incubaron durante 1 hora para permitir la formaci3n

de una monocapa. Los pozos de la placa se inocularon con un volumen de 900µl de diluciones décuples del virus amplificado o 900µl de medio Grace's (control negativo) y se incubó la placa con las células a temperatura ambiente, en agitación y protegidas de la luz. Después de 4 horas de incubación se eliminó el sobrenadante de cada pozo y se agregaron lentamente por las paredes 3ml de una mezcla de agarosa (50% de agarosa al 1.4% / 40% de medio Grace's / 10% de SFB), mantenida a 40°C en baño maría hasta el momento de su aplicación, y se incubó la placa con la cubierta por 4 días. A las 96 horas se inspeccionó la placa al microscopio y se adicionó a cada poco 2ml de una solución de tinte con rojo neutro (50% agarosa de bajo punto de fusión al 1.2% / 50% agua estéril / 250µl rojo neutro), que se permitió gelificar durante 15 minutos antes de incubar la placa a 27°C durante 1 día (paneles A y B de la Figura 22). A las 24 horas de tinción se evaluó a simple vista la presencia de claros en la monocapa correspondientes a la formación de placas, de las cuales se seleccionaron y recolectaron 5 con el vacío de una punta de 200µl para ser disueltas en 800µl de medio Grace's y usarse en la infección de cada uno de los pozos de una placa de cultivo de 6 pozos, preparados con una monocapa de células Sf9 (1.5×10^6 células/pozo). Para lo cual, se eliminó el sobrenadante y se inoculó lentamente cada pozo con 800µl del medio en el que se disolvió la placa, después de esto las células se incubaron con el inoculo en agitación durante 4 horas y se adicionó por goteo 2ml de medio SF900II.

96 horas posteriores a la infección de los pozos con las placas de baculovirus, se recolectaron los sobrenadantes y las células, resuspendiéndolas en 200µl de medio SF900II, y se usaron los sobrenadantes y pellets de 3 de las placas (1, 4 y 5) para examinar la expresión del anticuerpo mediante el Western blot de membranas de PVDF transferidas a partir de la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras y no reductoras.

Una vez hecha la selección de una placa viral, se usaron 400µl del sobrenadante del pozo infectado con esta placa para amplificar el baculovirus en 40ml de un cultivo en suspensión de células Sf9 que fue cosechado al observar una viabilidad inferior al 30%.

6.9 Titulación del baculovirus recombinante BacEDE1C8

El primer pase del baculovirus purificado de placa fue titulado a través de un ensayo de viabilidad descrito previamente (Mena et al. 2003), basado en la degradación del anillo tetrazólico del MTT por una deshidrogenasa mitocondrial en células viables y la formación de una sal insoluble de formazán de color magenta cuantificable espectrofotométricamente. Para esto se sembraron placas de cultivo de 96 pozos con 9×10^3 células Sf9 por pozo y se infectaron con diluciones décuples seriadas del baculovirus, realizando 16 repeticiones por cada dilución. Después de un periodo de incubación de 6 días en cámara húmeda se agregó a cada pozo 10µl de una solución de MTT (5mg/ml) y se incubaron las placas con las células en agitación orbital a temperatura ambiente y protegidas de la luz durante 2 horas. Después de una centrifugación de las placas a 2000rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se disolvieron los cristales de cada pozo en 50µl de DMSO. Por último, se incubaron las placas durante 3 minutos, se adquirieron los valores de absorbancia a 570nm a través de un lector de placas y se graficaron los valores promedio de absorbancia con sus desviaciones estándar contra las diluciones del baculovirus empleadas. Los valores obtenidos se ajustaron a un modelo sigmoide logístico de 4 parámetros usando el programa sigma plot a partir del cual se calculó el valor del título en DICC50% y su equivalente en unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ml).

Una vez determinado el título del pase 1 del baculovirus purificado de placa, se infectaron 50ml de un cultivo en suspensión de células Sf9 a una multiplicidad de infección de 0.1 (MOI 0.1) para generar un segundo pase de trabajo y proceder a realizar la producción del anticuerpo.

6.10 Producción del anticuerpo EDE1C8 en células de insecto

Para realizar la producción del anticuerpo EDE1C8 con el sistema baculovirus-células de insecto se llevó a cabo la infección de 2 cultivos en lote de células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) de un volumen de 300ml con el baculovirus recombinante BacEDE1C8 a una MOI de 1. Los cultivos de células en medio PSFM se cosecharon al observarse una viabilidad inferior al 30%, se clarificaron por centrifugación a 8000 rpm a 4°C durante 10 minutos y se ajustó su pH a un valor de 7 de manera previa a ser filtrados a través de una membrana de 0.45µm y procesados para la purificación del anticuerpo.

6.11 Purificación y determinación del patrón de N-glicosilación del anticuerpo EDE1C8 expresado en células de insecto

De manera similar a la descrita para la expresión en células CHO, la purificación del anticuerpo se realizó mediante cromatografía líquida con proteína A en una columna preempacada de 5ml (Praesto AP; Purolite). Después de equilibrar la columna, se cargaron las muestras con inyecciones únicas de 300ml a un flujo de 1.5ml/min, se volvió a equilibrar la columna y se eluyó el anticuerpo con ácido acético 0.1M a un flujo de 1ml/min. El pH de las fracciones recuperadas de la elución (5ml, cada una) se neutralizó inmediatamente con Tris a un valor de 7 y se filtraron las muestras a través de una membrana de 0.45µm de PDVF.

La determinación del patrón de N-glicosilación del anticuerpo EDE1C8 expresado en las células de insecto infectadas con el baculovirus recombinante, al igual que la realizada para el anticuerpo expresado en células CHO, se hizo a través de cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC). Brevemente, las muestras recuperadas de la cromatografía con proteína A se concentraron a un volumen de 500µl en un concentrador Savant, a partir de los cuales, se usaron 32.5µl para hacer la digestión con PNGasaF y la determinación. Para esto, se incubaron las muestras con 2.5µl de buffer desnaturante (SDS 2% / β-mercaptoetanol 1M) durante 10 minutos a temperatura ambiente y se llevaron a 40µl con una solución de IGEPAL al 7% y a 45µl con el buffer de la enzima (250mM fosfato de sodio, pH 7.5) antes de agregar 1 unidad de la enzima (1u/µl) y ajustar la reacción a un volumen final de 50µl. Después de un periodo de incubación de 15 horas a 37°C, las proteínas se precipitaron con 150µl de etanol en hielo durante 20 minutos y su centrifugación a 4000 rpm durante 5 minutos. Los glicanos concentrados a sequedad recuperados del sobrenadante se derivatizaron con 5µl de procaínamida, se aplicaron a discos de papel Whatman No1 de 1cm² de diámetro acomodados en embudos de vidrio preacondicionados con 2ml de agua miliQ, 5ml de ácido acético al 30% y 5ml de acetonitrilo al 100%. Después de una incubación de 15 minutos, los glicanos se lavaron con 10 lavados de 1ml con acetonitrilo al 100%, 10 lavados con el mismo volumen de acetonitrilo al 96% y se eluyeron con 4 lavados de 0.5ml. Una vez concentrados y resuspendidos en un volumen de 50µl, se usaron 10µl de las muestras con glicanos para inyectarse con 15µl de acetonitrilo al 100% en un sistema cromatográfico acoplado a un lector de masas y ser separados mediante HPLC con un gradiente de formato de amonio en función de su carácter hidrofílico y determinar las estructuras.

6.12 Evaluación de la funcionalidad del anticuerpo expresado en células de insecto

Para determinar que el anticuerpo EDE1C8 expresado en células de insecto infectadas con el baculovirus recombinante se tratase de una molécula funcional, se evaluó la reactividad del anticuerpo a través de su capacidad de reconocimiento específico por su epítipo en la superficie del virión mediante la técnica de *dot blot* y la cepa MR766 del virus del Zika, la cual se propagó en células C6/36 y se tituló mediante ensayo en placa.

Para la amplificación del virus se prepararon botellas de cultivo de 125cm² con células C6/36 crecidas hasta un 80% de confluencia en medio EMEM (ATCC) suplementado con 5% de suero fetal bovino. Para la infección, se retiró el sobrenadante con el medio, se hicieron 3 lavados de las células con PBS y las células se incubaron durante 2 horas a 27°C con un inóculo viral correspondiente a una multiplicidad de infección de 0.1 diluido en un volumen de medio fresco sin suplementar suficiente para cubrir la monocapa. Posteriormente, se realizaron lavados con PBS y las células se incubaron con 25ml de medio fresco suplementado con SFB durante 96 horas. Por último, se realizó la cosecha del stock viral mediante 3 ciclos de congelación a -70°C y descongelación a temperatura ambiente, su clarificado a 3,500 rpm durante 20 minutos y su filtrado a través de una membrana de 0.2µm antes de ser repartido en alícuotas almacenadas a -70°C hasta su uso. Como control negativo, se incubaron las células C6/36 de una botella de cultivo con un volumen de medio igual al volumen del inóculo viral y se sometieron al mismo procedimiento.

Para la titulación mediante ensayo en placa, se usaron placas de 24 pozos preparadas con 3x10⁵ células Vero por pozo el día anterior al ensayo y se inspeccionó al microscopio la formación de una monocapa. Para la infección, se descartó el sobrenadante, se realizaron 3 lavados con 500µl de PBS a los pozos y se incubó cada uno con 200µl de medio DMEM sin suero y 100µl de diluciones decuples del virus propagado en células C6/36 o el mismo volumen de medio (control negativo) durante 2 horas a 36°C. Posteriormente, se eliminó el inóculo viral, se hicieron lavados con PBS y se adicionaron a cada pozo 200µl de DMEM con 10% SFB y 800µl de una mezcla de DMEM con 1.5% de carboximetilcelulosa. La placa se incubó con la cubierta de CMC dentro de una cámara húmeda en una incubadora a 36°C y una atmósfera de 5% de CO₂ durante 6 días para permitir la formación de placas. Por último, se descartó la cubierta de CMC y se cubrieron los pozos con una solución de tinte (0.5% cristal violeta / 4% formaldehído / 20% metanol) durante 30 minutos, antes de eliminar el exceso de colorante con agua y determinar el título de unidades formadoras de placa.

Para llevar a cabo una evaluación inicial de la capacidad de reconocimiento del anticuerpo mediante *dot blot*, se colocaron 300µl de virus (título 1×10^6 UFP/ml) o el mismo volumen de clarificado proveniente del lisado de células C6/36 sin infectar (mock) en una membrana de PVDF usando un sistema de microfiltración por vacío (BioDot SF; BioRad). Una vez transferidas las muestras, se bloquearon los espacios libres en la membrana incubándola con una solución de leche descremada al 5% en TBS durante 16h a 4°C en agitación orbital. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS y la membrana se incubó durante una hora con una dilución 1/1000 de una muestra del anticuerpo EDE1C8 concentrada a un valor de 1mg/ml a partir de la fracción recuperada de la cromatografía con proteína A del cultivo de células de insecto. Por último, se realizaron lavados con TBS, la membrana se incubó durante 1 hora con una dilución 1/5,000 del anticuerpo secundario conjugado a HRP (goat anti-human IgG HRP; Jackson) y se reveló por quimioluminiscencia.

Para comparar la capacidad de reconocimiento específico del anticuerpo EDE1C8 expresado en células de insecto con respecto al expresado en células CHO, se adaptó la técnica de *dot blot* al formato de 24 pozos descrito por Sumi con algunas modificaciones (Sumi et al. 2009). Para esto se prepararon las placas de 24 pozos con discos de PVDF de 1.5cm de diámetro preactivados con metanol y buffer de transferencia. Se colocaron lentamente 50µl del virus del Zika (1×10^6 UFP/ml) o del lisado de células sin infectar y se incubaron las placas durante 16 horas a 4°C. Posteriormente, se bloquearon los espacios libres en la membrana de cada pozo con 300µl de leche descremada al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación orbital a 280 rpm. Una vez bloqueadas las membranas, se realizaron 3 lavados con TBS y se incubaron los pozos durante 1 hora con un volumen de 300µl de 5 diluciones del anticuerpo EDE1C8 expresado en células de insecto o células CHO en un rango de 1/1,000 a 1/10,000 (1/1,000 1/2,500 1/5,000 1/7,500 y 1/10,000) a partir de muestras de anticuerpo puro de 1mg/ml. Posteriormente, se realizaron lavados, se incubó durante 1 hora con 300µl de una dilución 1/5,000 de anticuerpo secundario (goat anti-human HRP; Jackson), se añadieron 20µl de sustrato (Immobilon Forte Western HRP Substrate, Merck Millipore) a cada pozo y se reveló la placa por quimioluminiscencia, usando el sistema de Chemidoc MP (BioRad) y el software ImageLab para adquirir los resultados.

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 Expresión del anticuerpo EDE1C8 en células CHO

La concentración de células viables y totales del cultivo en lote de las células CHO-S EDE1C8 fue promediada y los valores utilizados para graficar la cinética de crecimiento ilustrada en la figura 9, correspondiente a un experimento representativo. La concentración de las células al inicio de la cinética fue de 1.176×10^6 células totales por mililitro con un 98% de viabilidad. Por otro lado, la disminución de la viabilidad por debajo del 95% se observó a las 105 horas (cuarto día), momento en el cual se registró una viabilidad del 80.5% y concentraciones celulares de 9.6×10^6 y 7.7×10^6 células totales y viables por mililitro respectivamente, por lo cual, se llevó a cabo la recolección del medio con el anticuerpo para evitar una mayor exposición de este a proteasas resultantes del incremento en la mortalidad celular.

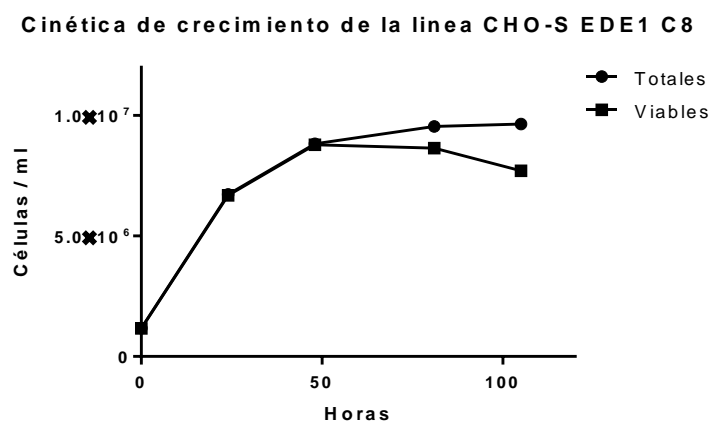


Figura 9. Cinética de crecimiento de las células CHO-S-EDE1C8 productoras de anticuerpo.

Después de la cromatografía de afinidad con proteína A del sobrenadante del cultivo de células CHO recombinantes se recuperó un volumen de 5ml en la fracción eluída. El pH ácido de esta fracción se neutralizó y una vez dializada, esterilizada por filtración ($0.2 \mu\text{m}$) y dividida en alícuotas, esta muestra se almacenó a -20°C para su posterior uso. Se obtuvo una concentración de $930 \mu\text{g/ml}$ de los 5ml de anticuerpo eluído del proceso cromatográfico con proteína A. En la figura 10 se puede apreciar el proceso de purificación del anticuerpo en un gel de poliacrilamida al 10%. En el carril correspondiente al sobrenadante del cultivo (carril 1) se puede observar una banda de proteína que migra por encima de la referencia de 220 kDa del marcador, la cual desaparece en la fracción no unida a la columna (carril 2). En el carril 5, correspondiente a la fracción eluída de la columna, se observa un bandeo entre las referencias de 160 y 220 kDa, a una altura aproximada a la del control positivo (IgG pura) en el carril 3. Por último, al realizar la electroforesis de la fracción eluída, pero utilizando un buffer de carga con el agente reductor β -mercaptoetanol, aparecen 2 bandas de proteína a 25 y 50 kDa, compatibles con las cadenas ligera y pesada del anticuerpo.

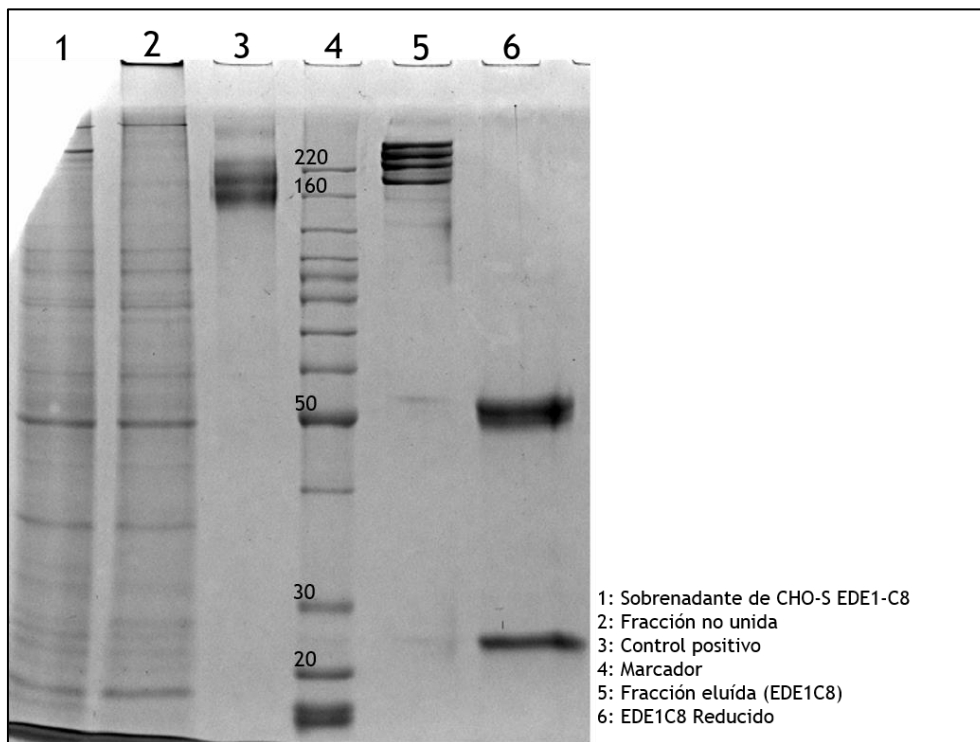


Figura 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% del proceso de purificación con proteína A del anticuerpo EDE1C8 expresado en células CHO.

7.2 Determinación del patrón de N-glicosilación del anticuerpo EDE1C8 expresado en células CHO

El anticuerpo purificado proveniente del cultivo en lote de las células CHO productoras se usó para realizar la digestión con PNGasaF de los glicanos unidos a la porción Fc, el marcaje de los mismos con 2-AB y su inyección en un sistema cromatográfico para su separación por cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC). En la figura 11 se pueden apreciar las estructuras identificadas. Se observó una constitución mayoritaria por glicanos de tipo complejo con predominancia de formas carentes de galactosa terminal (G0), seguidas de formas con galactosa terminal en uno de los 2 brazos del glicano (G1).

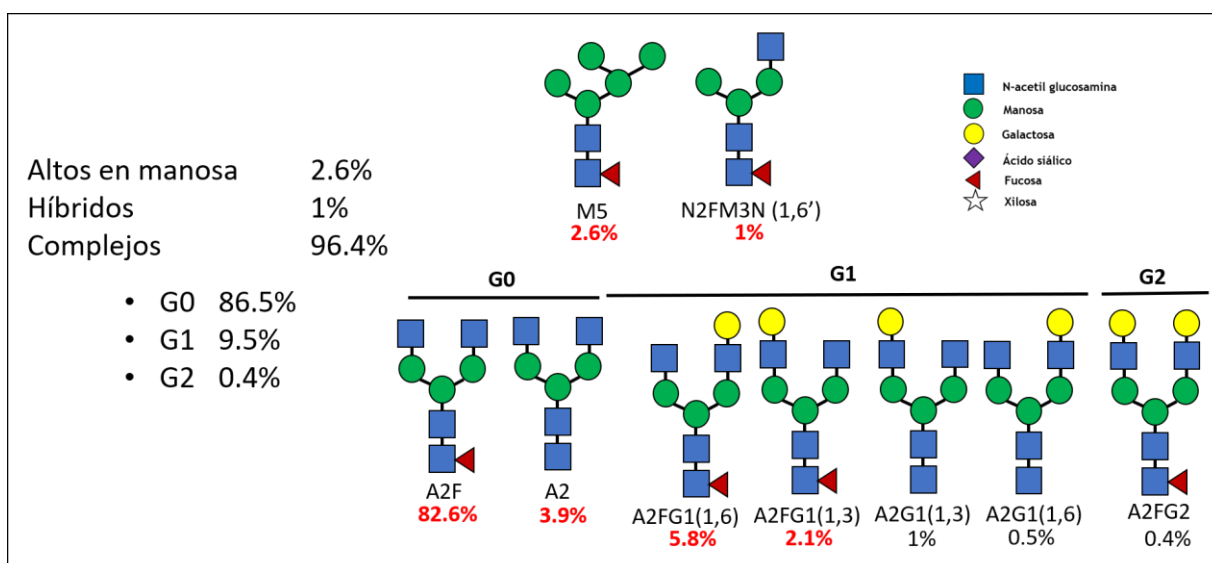


Figura 11. Patrón de N-glicosilación del anticuerpo EDE1C8 expresado en células CHO.

7.3 Clonación de las secuencias de las cadenas del anticuerpo y construcción de plásmidos donadores

7.3.1 Análisis del patrón de digestión del vector pCHO-EDE1C8

Para realizar la clonación de las secuencias del anticuerpo EDE1C8 en el vector pFastBacDual con los primers diseñados en la sección de métodos y la construcción del vector Freedom pCHO con estas secuencias, se seleccionaron 3 colonias de la cepa TOP10 de *E. coli* con la construcción a las cuales se realizó su cultivo líquido y extracción de ADN plasmídico. Para confirmar la presencia del vector con las secuencias de las cadenas del anticuerpo (15.12kpb) en 2 de estas colonias, se seleccionaron los sitios para las enzimas EcoRV, KpnI y NheI del mapa de restricción del vector (Figura 12). Las enzimas que reconocen estos sitios cortan una sola vez en el vector, con excepción de NheI, que, en caso de la incorporación de la cadena pesada del anticuerpo entre los sitios AvrII y BstZ17L, presenta un segundo sitio de corte dentro de la secuencia del inserto que permite evidenciar la presencia de la cadena pesada como la generación de 2 bandas en un gel de agarosa (mapa de restricción de la cadena pesada del anticuerpo EDE1C8 en el Anexo I).

Para cada colonia se realizaron digestiones de 200ng y se usaron las enzimas en las siguientes combinaciones: I) EcoRV, II) EcoRV + KpnI y III) NheI, de modo que se obtuviera un solo producto de 15.12kb correspondiente al vector linealizado con EcoRV (Figura 12, carriles 3 y 7), 2 productos de 12.4 y 2.7 kb para la doble digestión (Figura 12, carriles 4 y 8) y 2 productos de 12.5 y 2.5 kb para la digestión sencilla con NheI (Figura 12, carriles 5 y 9), además de incluir el vector sin digerir como control negativo. En la figura 12 se ilustra el gel del análisis de restricción, en el cual se aprecian bandas de un tamaño esperado, así como la cantidad de fragmentos esperados para cada condición. Una vez confirmada la identidad del vector a través de su patrón de restricción se procedió a amplificar las secuencias de las cadenas del anticuerpo y el análisis de restricción del vector pFastBacDual.

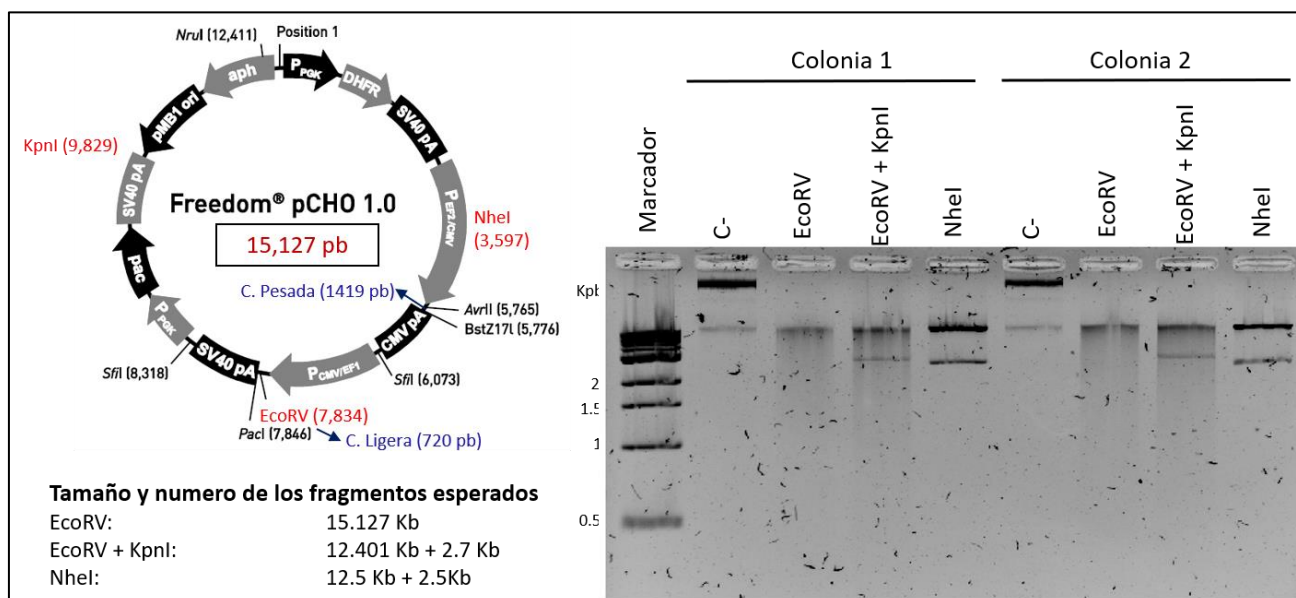


Figura 12. Análisis del patrón de digestión del vector Freedom pCHO-EDE1C8. Izquierda) Mapa del vector pCHO con la inserción de las secuencias de la cadena ligera (sitios EcoRV y PacI) y pesada (sitios AvrII y BstZ17L del anticuerpo). Derecha) digestión del vector extraído de 2 colonias con las combinaciones EcoRV, EcoRV + KpnI y NheI.

7.3.2 Análisis del patrón de restricción del vector pFastBacDual

La identidad del vector pFastBacDual extraído de las colonias resultantes de la transformación se confirmó a través de la comparación de su patrón de restricción con el de los vectores pFastBac y pFastBacDual GusCat. En la figura 13 se muestra el patrón de restricción de las reacciones de digestión de 500ng del vector pFastBacDual, en comparación con los vectores pFastBac y pFastBacDual GusCat. Para el análisis se seleccionaron las enzimas HindIII, que lineariza a los 3 vectores de distinto tamaño, NheI, cuyo único sitio en el MCS de pFastBacDual lineariza a este vector, y la combinación HindIII EcoRV, que genera 2 fragmentos de diferente tamaño para pFastBac (1312pb y 3463pb), pFastBacDual (1774pb y 3464pb) y pFastBacDual GusCat (4244pb y 3599pb). En los productos mostrados en el gel de la figura 13 se puede apreciar tanto la linearización de los vectores de acuerdo con su tamaño por parte de la enzima HindIII, así como la linearización del vector pFastBacDual por la enzima NheI, correspondiente con la presencia del sitio de restricción exclusivamente en este vector.

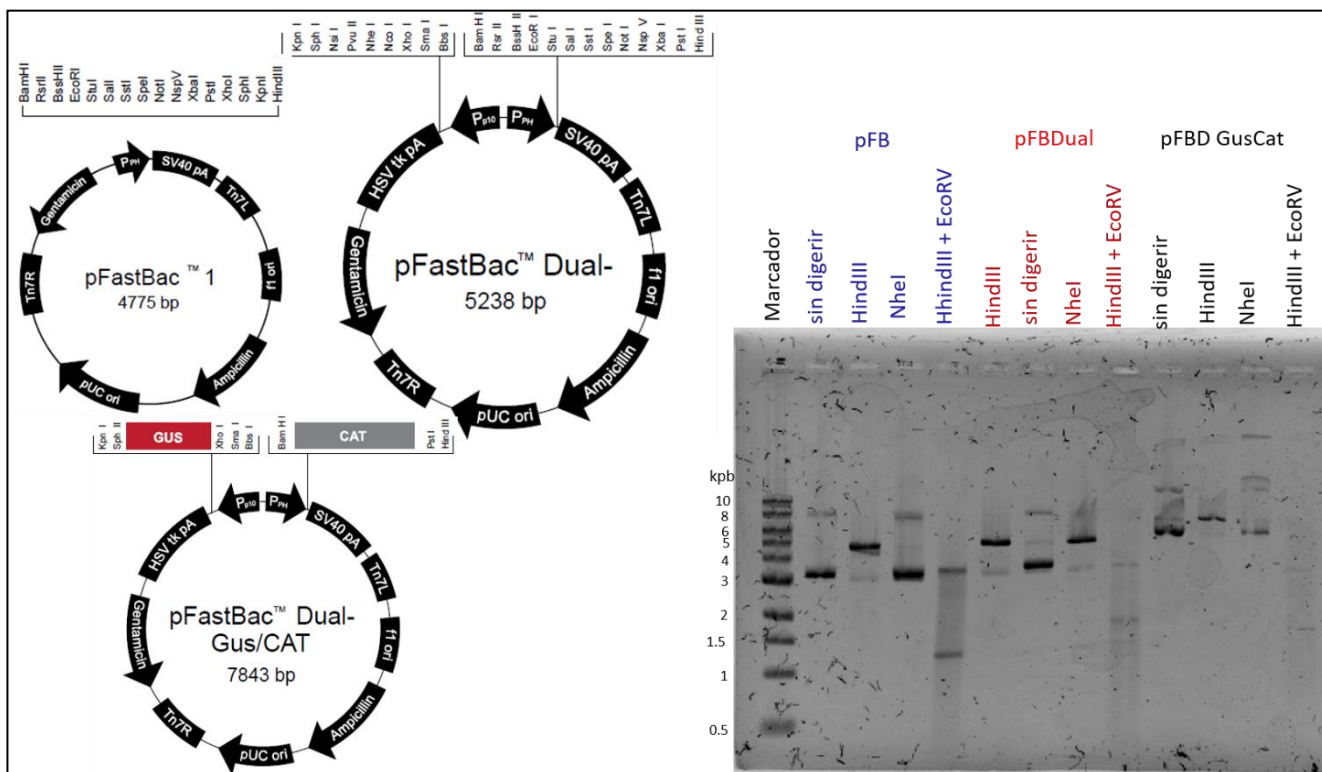


Figura 13. Análisis del patrón de digestión del vector pFastBacDual. Izquierda) Mapa de los vectores pFastBac, pFastBacDual y pFastBacDual GusCat. Derecha) Digestión de los vectores pFastBac (azul), pFastBacDual (rojo) y pFastBacDual GusCat (negro) con las combinaciones HindIII, NheI y HindIII + EcoRV.

7.3.3 Amplificación de la secuencia de la cadena ligera del anticuerpo EDE1C8

En la figura 14, correspondiente a las reacciones de PCR de la cadena ligera partir de la construcción pCHO-EDE1C8 de las 3 colonias seleccionadas, se aprecia la formación de un producto definido en los carriles de las colonias 1 y 3, el cual comigra con la banda de 700pb del marcador. Por el contrario, este fragmento compatible con la cadena ligera (740pb) apenas fue perceptible para la colonia 2, por lo cual para la clonación de la cadena ligera se descartó esta colonia. Es importante señalar que las condiciones capturadas en la figura 14 corresponden a la primera visualización de productos compatibles con cadena del anticuerpo, a partir de los cuales se trabajó en la optimización de las condiciones registradas en las tablas 1 y 2 de la sección de material y métodos.

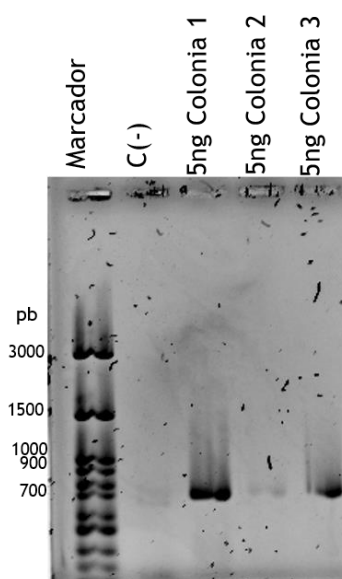


Figura 14. Amplificación de la secuencia de la cadena ligera del anticuerpo EDE1C8

7.3.4 Clonación de la secuencia de la cadena ligera del anticuerpo en el vector pFastBacDual

Después de confirmar la identidad de los vectores pCHO-EDE1C8 y pFastBacDual a partir de su patrón de digestión, se realizaron varias reacciones para amplificar la secuencia de la cadena ligera con el templado de la colonia seleccionada (Figura 15A), se analizó la actividad de las enzimas seleccionadas BamHI y HindIII en el vector (Figura 15B) y se realizó la digestión simultanea del vector (Figura 15C) y del fragmento de PCR. Después de la defosfatación del vector, los productos de las digestiones se utilizaron para preparar la reacción de ligación (2h a 24°C, relación molar 1:10) y realizar la transformación de las células competentes.

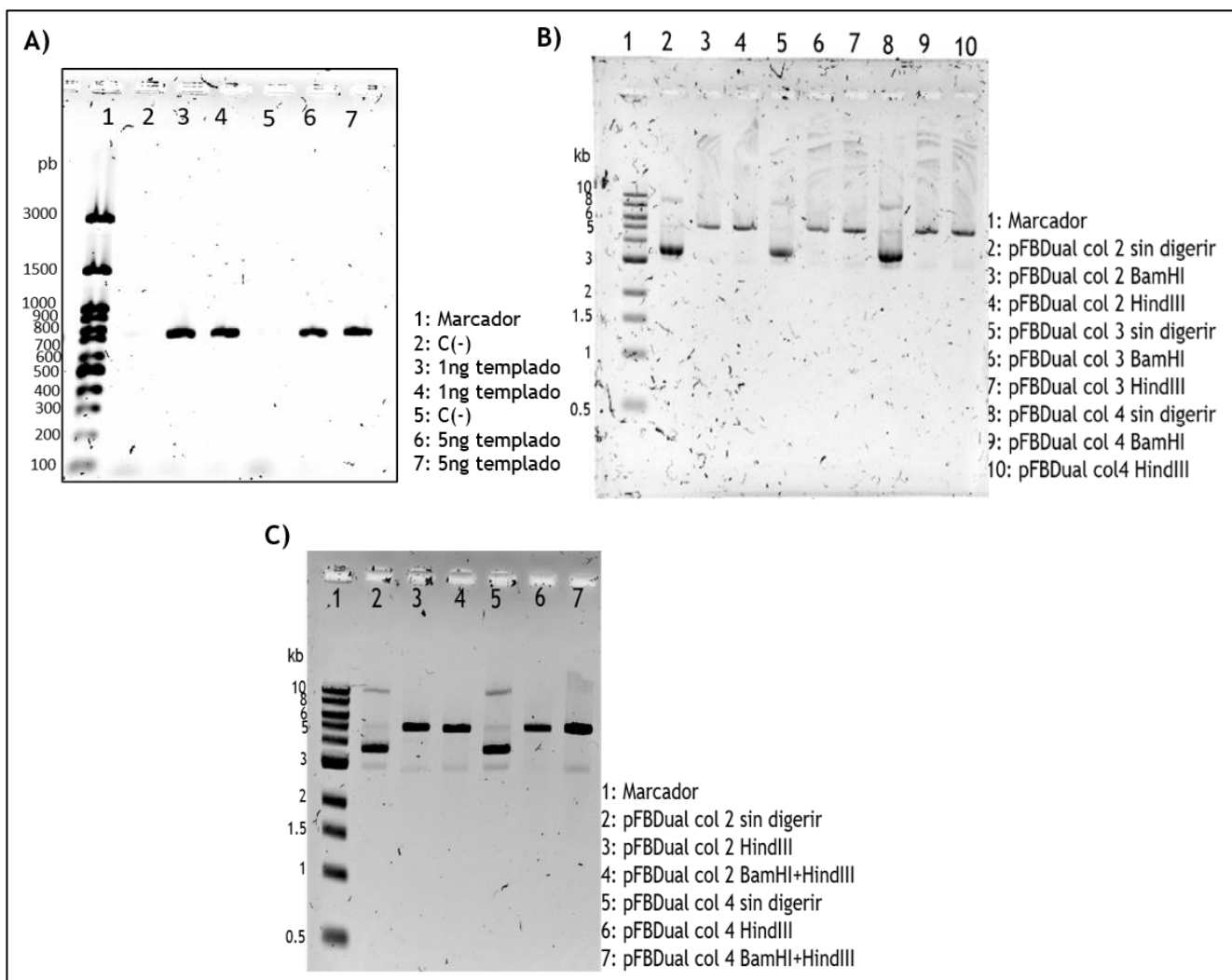


Figura 15. Geles del proceso de clonación de la secuencia de la cadena ligera del anticuerpo EDE1C8 en el vector pFastBacDual. A) Amplificación de la cadena ligera del anticuerpo. B) Actividad de las enzimas BamHI y HiindIII en los sitios de restricción seleccionados en el vector pFastBacDual C) Gel analítico de las reacciones de digestión dobles con BamHI y HindIII usadas en la clonación (se incluyen digestiones sencillas y de vector sin digerir con fines analíticos).

A partir de la transformación con el producto de ligación, se obtuvieron 44 colonias de la reacción sin ligasa (falsos positivos), 116 de la reacción sin inserto (re ligados) y 168 colonias con ligasa e inserto de interés, de las cuales se estriaron 60 colonias y se analizaron 20 mediante PCR de colonia para confirmar la presencia de la construcción con la secuencia de la cadena ligera (condiciones en las tablas 3 y 4 de la sección material y métodos). Los geles de la figura 16 ilustran la electroforesis en gel de agarosa de los productos de las reacciones de PCR de colonia, en los cuales se puede observar la presencia de un producto compatible con el tamaño de la cadena ligera para los carriles correspondientes a las colonias 37, 43 y 52. Por lo cual, se realizó la preservación de estas colonias en glicerol y se seleccionó la colonia 37 para los siguientes pasos.

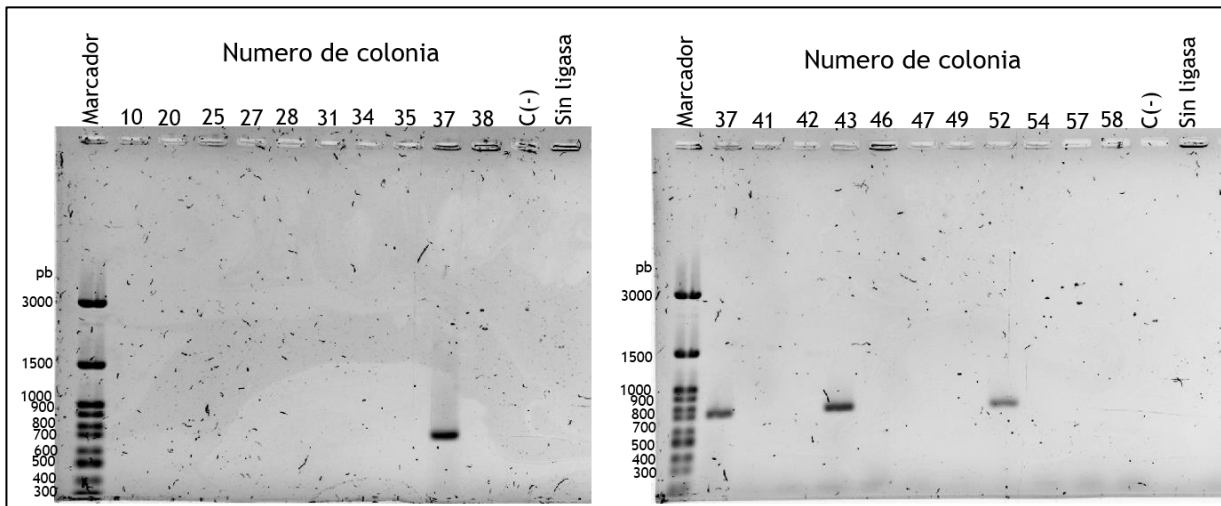


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de las reacciones de PCR de colonia para la cadena ligera.

7.3.5 Amplificación y clonación de la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo en el vector pFastBacDual

Para llevar a cabo la clonación de la secuencia de la cadena pesada en el vector pFastBacDual con las dos estrategias planteadas, se utilizaron los *primers* de cada estrategia en una PCR de gradiente de temperatura. En la figura 17 se ilustran los resultados de las reacciones de PCR para la amplificación de la secuencia de la cadena pesada con los dos pares de *primers*. Como puede apreciarse en los geles de las dos estrategias, en todas las condiciones de temperatura probadas se observó un fragmento a una altura aproximada de 1500pb compatible con la cadena pesada (1439pb).

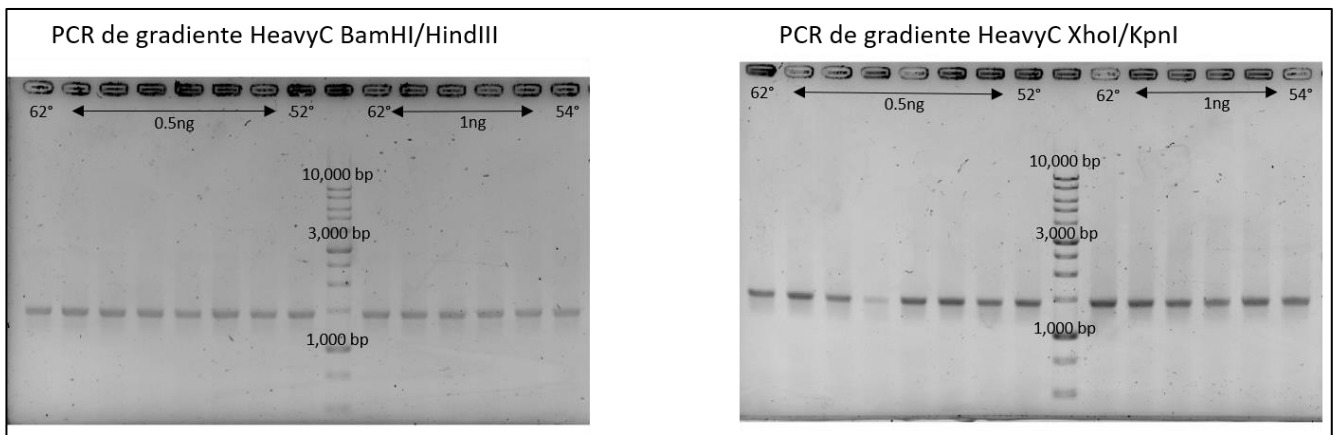


Figura 17. Amplificación de la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo EDE1C8 utilizando PCR de gradiente de temperatura. Izquierda) Amplificación de la cadena pesada del anticuerpo con la adición de los sitios BamHI y HindIII para la estrategia de 2 baculovirus. Derecha) Amplificación de la cadena pesada con la adición de los sitios XhoI y KpnI para la estrategia de 1 baculovirus recombinante con los promotores polH y P10.

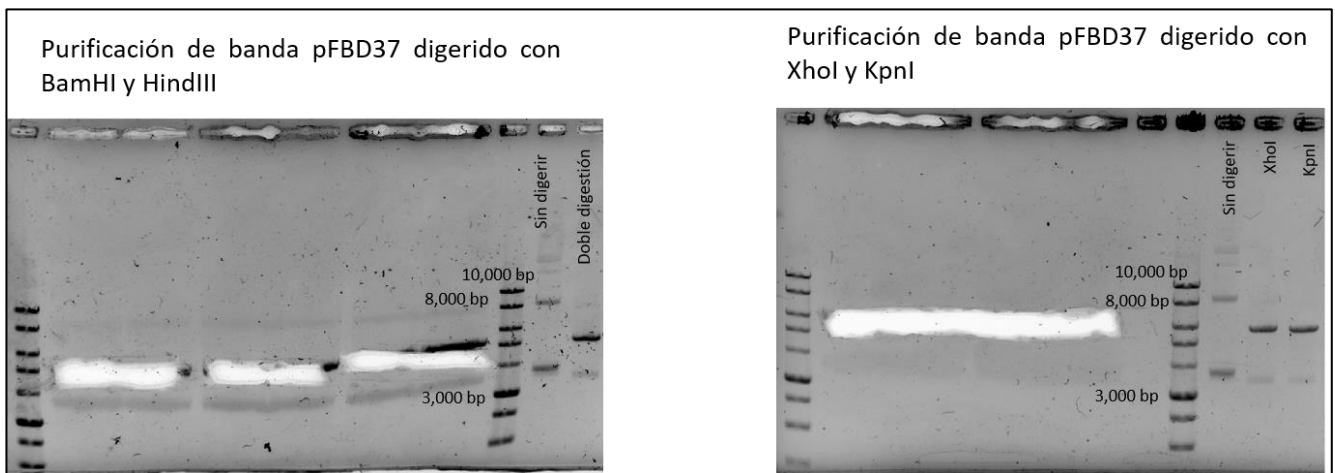


Figura 18. Digestión y purificación de banda del vector pFastBacDual con la secuencia de la cadena ligera. Purificación de banda de la digestión del vector con las enzimas BamHI y HindIII (izquierda) para la estrategia de 2 baculovirus o XhoI y KpnI (derecha) para la estrategia de 1 baculovirus. En los últimos carriles se incluyen algunas digestiones con fines analíticos.

Una vez amplificada la secuencia de la cadena pesada con los sitios para las enzimas BamHI y HindIII para la estrategia de 2 baculovirus (1 construcción), o los sitios de las enzimas XhoI y KpnI para la estrategia de 1 baculovirus (2 construcciones diferentes del plásmido donador), los productos resultantes de la digestión de sus amplicones (Figura 17) y de la digestión y purificación de banda del vector pFBD-EDE1C8-Light procedente de la colonia 37 (Figura 18) se usaron para preparar las reacciones de ligación correspondientes (relación molar 1:7) y la transformación de células competentes. En la figura 19 se muestran los resultados de la reacción de PCR a partir de colonia bacteriana para confirmar la presencia de las construcciones con la cadena pesada. Debido a un resultado positivo en ambos casos, se preservaron varias colonias con la construcción que alberga solo la secuencia de la cadena pesada para la estrategia de dos baculovirus (pFBD-EDE1C8-Heavy) y colonias con la construcción correspondiente a la estrategia de un solo baculovirus con las secuencias de las 2 cadenas del anticuerpo (pFBD-EDE1C8-L+H). Debido a la practicidad derivada de contar con las secuencias de las 2 cadenas del anticuerpo en un solo vector viral para llevar a cabo la infección de las células de insecto y la producción del anticuerpo, se seleccionó la construcción pFBD-EDE1C8-L+H para continuar con la generación del báculo recombinante y el baculovirus correspondiente.

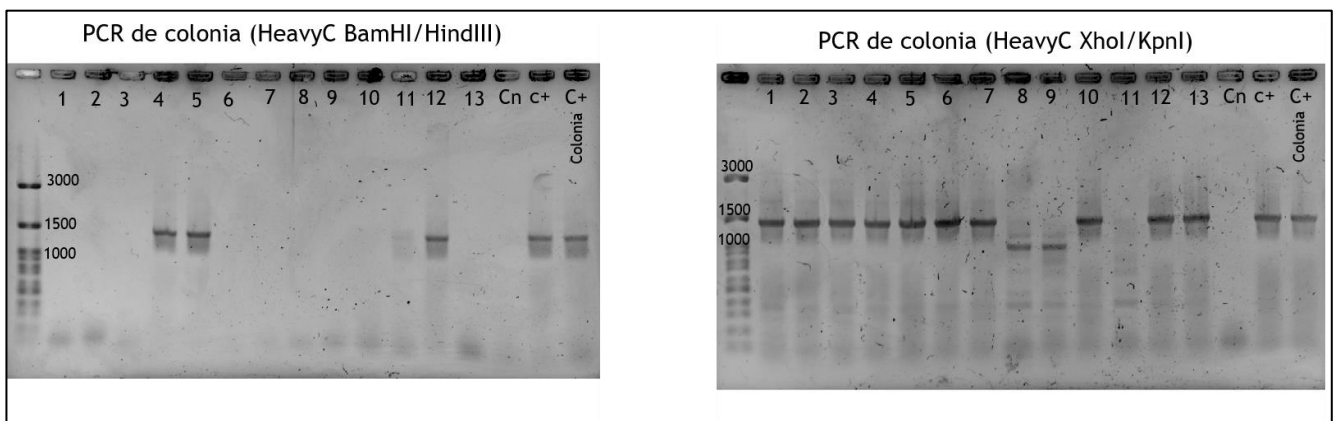


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa de las reacciones de PCR de las colonias transformadas con la reacción de ligación con la cadena pesada del anticuerpo.

7.4 Transformación de células DH10Bac y análisis del báculo recombinante en las colonias transformadas con el plásmido donador.

La construcción del plásmido donador pFBD-EDE1C8-L+H con las secuencias de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo fue recuperada de las colonias seleccionadas y se utilizó en la transformación de células de *E. coli* DH10Bac que albergan el báculo bMON1472. Las colonias que no desarrollaron una coloración azul en presencia de IPTG y Xgal, las cuales indican el evento de transposición y la interrupción del gen LacZ, fueron estriadas para confirmar su fenotipo y aquellas que desarrollaron nuevamente un fenotipo LacZ(-) fueron analizadas mediante PCR de colonia para verificar la inserción del casete de transposición con las secuencias de las cadenas del anticuerpo en la orientación correcta.

En el báculo vacío, los sitios de inserción del casete de transposición se encuentran flanqueados por secuencias para *primers* del fago M13 (panel A, figura 20), de manera que la amplificación de la región entre estos 2 fragmentos da como resultado un producto de 300pb, por el contrario, en el caso de un evento de transposición exitosa, se obtiene un producto con una longitud de 2560pb más el tamaño del inserto, que para el caso de las 2 cadenas del anticuerpo corresponde a un tamaño total de 4660pb, como se ilustra en el panel B de la figura 20. Por otro lado, al verificar de manera individual la inserción de la secuencia de la cadena ligera con los *primers* Light Fwd y M13 Rev debe observarse un producto de 1341pb (panel D, figura 20) y para el caso de la cadena pesada un producto de 2560pb (panel C, figura 20) con los *primers* M13 Fwd y HeavyC Mid, que hibrida a la mitad de la secuencia de la cadena pesada.

Como puede apreciarse en el panel D de la figura 20, en 13 de las 14 colonias con fenotipo LacZ(-) mostradas se observó la banda indicativa de la inserción de la secuencia de la cadena ligera, sin embargo, como se aprecia en el panel B, algunas de estas colonias presentaron contaminación por bacterias con el báculo no recombinante (colonias 2 y 4 en el panel B de la Figura D). Adicionalmente, al verificar la inserción de la secuencia de la cadena pesada se observó la ausencia de un producto en las colonias 2, 5, 9 y 10. Esta ausencia de la banda del casete de transposición completo o de alguna de las cadenas individuales puede deberse al alineamiento con las secuencias de báculos no recombinantes, a un evento de recombinación entre las secuencias de inserción o a una transposición incompleta. Sin embargo, la presencia de los 3 productos y la ausencia del segmento correspondiente al báculo vacío es necesaria para indicar la inserción del casete de transposición completo en la orientación correcta y la ausencia de báculos no recombinantes que pueda dar origen a baculovirus capaces de competir con los baculovirus que albergan las secuencias de las cadenas del anticuerpo e interferir con la expresión del anticuerpo EDE1C8 en las células de insecto. Debido a esto, se seleccionaron las colonias 7 y 8 para realizar la extracción del báculo y la generación del baculovirus.

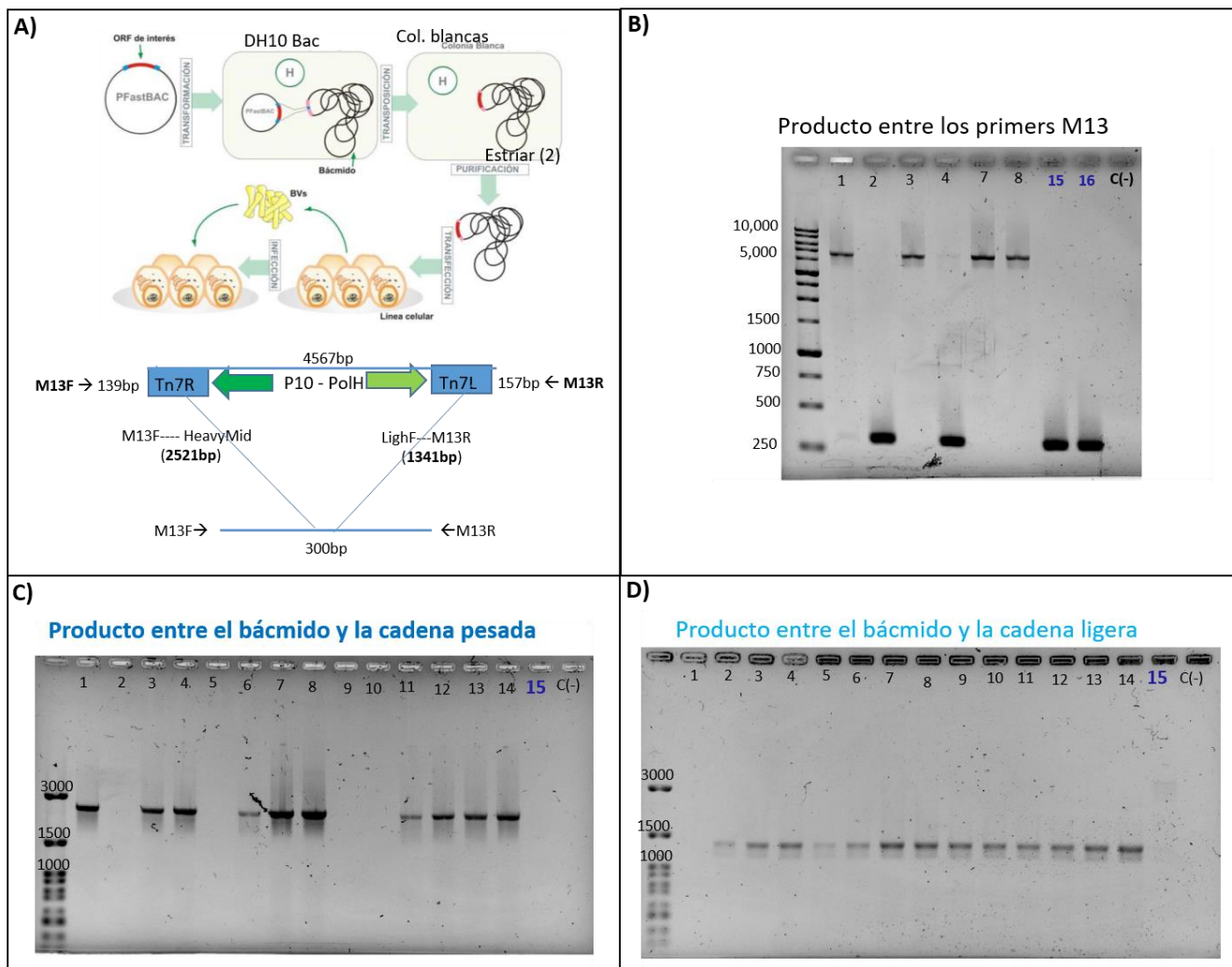


Figura 20. Análisis del báculo recombinante bacEDE1C8. A) En la parte superior se esquematiza el proceso para la generación de un baculovirus recombinante que incluye: la construcción de un plásmido donador con las secuencias de interés, la transformación de células *E. coli* DH10Bac que albergan el báculo con los sitios de inserción para el casete de transposición, la selección de colonias de color blanco resultantes de la transposición e interrupción del gen *LacZ*, y la transfección con el báculo recombinante para la generación de los baculovirus. En la parte inferior se representa la región entre los *primers* M13 en el báculo vacío, así como el casete de transposición (flanqueado por los brazos del transposón Tn7 representados en azul) con las secuencias de las cadenas ligera (verde claro) y pesada (verde oscuro) del anticuerpo. B) Productos de PCR de colonia con los *primers* M13 *forward* y *reverse*. C) Amplificación por PCR de colonia de la región comprendida entre el báculo y la mitad de la cadena pesada del anticuerpo. D) Amplificación por PCR de colonia de la región comprendida entre la cadena ligera del anticuerpo y el báculo. Los números de los carriles en los paneles B, C y D corresponden a la identificación de las colonias, los carriles con números azules corresponden a colonias con fenotipo *Lac+* utilizadas como controles de las reacciones de PCR de colonia. Como un control adicional se incluyó la mezcla de reacción sin colonia (C(-)).

7.5 Transfección de células de insecto con el báculo recombinante y expresión del anticuerpo en las células transfectadas

Para continuar con el proceso de generación del baculovirus recombinante, una vez realizada la purificación en condiciones estériles de los báculos de las colonias 7 y 8 mediante lisis alcalina, se usó el báculo recombinante de la colonia número 7 para transfectar células de insecto de la línea Sf9 y confirmar la expresión de las cadenas del anticuerpo. En la figura 21 se muestra el resultado del Western blot realizado al pellet celular y a los sobrenadantes recolectados a las 96 y 192 horas post-transfección (h.p.t) a partir de las células transfectadas con 750 y 1500ng del báculo recombinante.

Como puede observarse, aunque no fue posible detectar una señal con ninguna de las 2 cantidades de b acmido en el sobrenadante a las 96 horas post-transfección, ambas cantidades generaron señales a las 196 h.p.t., tanto en el sobrenadante como en el pellet de las células, en los cuales fue posible distinguir 2 bandas del tamaño esperado para las cadenas individuales del anticuerpo. Una vez detectada la expresión de las cadenas del anticuerpo en el sobrenadante de las células transfectadas con el b acmido recombinante, se usó 1 ml del sobrenadante recuperado a las 192 horas de la transfección con 1500ng para amplificar el baculovirus recombinante a través de la infección de un cultivo de 30ml de células Sf9.

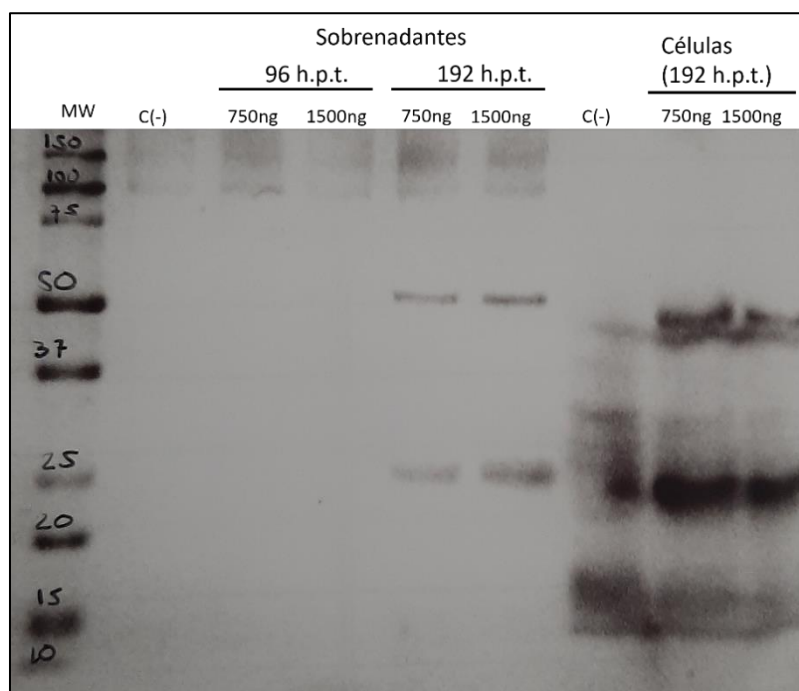


Figura 21: Expresión del anticuerpo EDE1C8 en las células transfectadas con el b acmido recombinante. MW, marcador de peso molecular; C(-) control negativo.

7.6 Purificación de placa del baculovirus recombinante BacEDE1C8

Una vez clarificado, el sobrenadante de la amplificación del baculovirus en células Sf9 se utilizó para realizar un ensayo en placa y la purificación del baculovirus recombinante a partir de una placa del mismo, de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección de material y métodos. En los paneles A y B de la figura 20 se muestran el ensayo realizado, teñido con rojo neutro para la visualización de las placas (96 h.p.i), y un esquema del mismo con las diluciones del sobrenadante con el baculovirus utilizadas. Una vez que se recolectaron algunas de las placas virales y se usaron en la infección de los pozos con monocapas de células Sf9, se evaluó la expresión del anticuerpo.

En los paneles C y D de la figura 22 se muestra el Western blot realizado a los sobrenadantes y pellets de las células infectadas con 3 de las placas (1,4 y 5) realizado a las 96 horas posteriores de la infección con las placas de baculovirus a partir de los geles en condiciones reductoras y no reductoras. En el panel C, correspondiente al Western blot del gel en condiciones reductoras se puede apreciar, tanto en el sobrenadante como en el lisado celular, la detección de bandas compatibles con las cadenas de un anticuerpo (señaladas con las flechas). Por otra parte, en el Western blot correspondiente al gel en

condiciones no reductoras (panel D), de manera adicional a estas bandas se detectaron otras de un tamaño superior a las cadenas individuales del anticuerpo, incluyendo su detección en el sobrenadante. Esta variedad de bandas apreciadas principalmente en el lisado celular es encontrada frecuentemente al inspeccionar en condiciones no reductoras la expresión de un anticuerpo recombinante, y corresponde a distintas poblaciones de dímeros y trímeros que se pueden ensamblar entre las cadenas ligera y pesada (Robinson et al. 2015, Liu et al. 2007, Chan et al. 2010), de manera que la presencia de estas bandas se atribuye al proceso de biosíntesis y ensamblado del anticuerpo o a un proceso de degradación (fragmentación) del mismo. Para confirmar con certeza la identidad de cada uno de estos fragmentos de anticuerpo, algunos autores han empleado técnicas de separación cromatográfica acopladas a un análisis de espectrometría de masas y han verificado simultáneamente la presencia por separado de las cadenas del anticuerpo en los fragmentos mediante Western blot (Liu et al. 2007, Wang S et al. 2018), no obstante, frecuentemente se ha observado que mientras la cadena ligera generalmente es detectada a una altura de 25 kDa y la cadena pesada a una altura aproximada de 50 kDa, la banda que comigra con la referencia de 75 kDa corresponde al heterodímero de las 2 cadenas (H1+L1), la banda a 100 kDa al dímero de las 2 cadenas pesadas (2H), la señal a 150 kDa al fragmento carente de una cadena ligera (H2+L1) y las bandas por arriba de 150 kDa al anticuerpo con el heterotetrámero de las 2 cadenas ligeras y las 2 cadenas pesadas (H2+L2). Adicionalmente, se ha reportado que la detección de bandas por debajo de la cadena pesada generalmente corresponde a la formación de fragmentos resultantes de su degradación y que puede presentarse la detección de 2 formas libres de la cadena ligera con diferentes estructuras en sus puentes disulfuro intracatenarios (Liu et al. 2007), las cuales pueden apreciarse de una manera similar a las 2 bandas próximas a la referencia de 20 kDa en el panel D. Por lo tanto, es posible atribuir las diversas bandas observadas en el Western blot del lisado celular a partir de condiciones no reductoras a la presencia de estas distintas poblaciones de fragmentos de anticuerpo descritas en la literatura y al proceso de ensamblado del anticuerpo en el interior de las células. Por otro lado, como puede apreciarse en la misma imagen, pero en los carriles de los sobrenadantes de las células, la señal de las bandas de tamaño superior a las cadenas individuales es de menor intensidad a la señal de las mismas en el lisado celular, lo cual indica una menor cantidad de anticuerpo con respecto al interior celular y es sugerente de una baja secreción del anticuerpo. Esta situación ha sido observada de manera común en la expresión de anticuerpos con el sistema baculovirus-células de insecto (Cérutti & Golay 2012) y puede presentarse como resultado de un obstáculo durante el plegamiento del anticuerpo o debido a que, aunque el sistema de expresión es capaz de escindir péptidos señales de proteínas de origen humano, la secuencia del péptido es subóptima, por lo que suele ser abordada a través del remplazo y optimización de la secuencia del péptido señal (Futatsumori-Sagai & Tsumoto 2010) o mediante la coinfección con baculovirus recombinantes que codifiquen proteínas que asistan el plegamiento de los anticuerpos e incrementen su secreción (Cérutti & Golay 2012). Debido a estas situaciones y a la mayor intensidad de sus señales, incluyendo las detectadas en el sobrenadante con un tamaño superior a las cadenas individuales que sugieren la secreción del anticuerpo en una forma ensamblada, se seleccionó la placa número 5 y se usaron 400µl del sobrenadante del pozo proveniente de la infección con esta placa para amplificar el baculovirus en 40ml de un cultivo en suspensión de células Sf9 que fue cosechado al observar una viabilidad inferior al 30%.

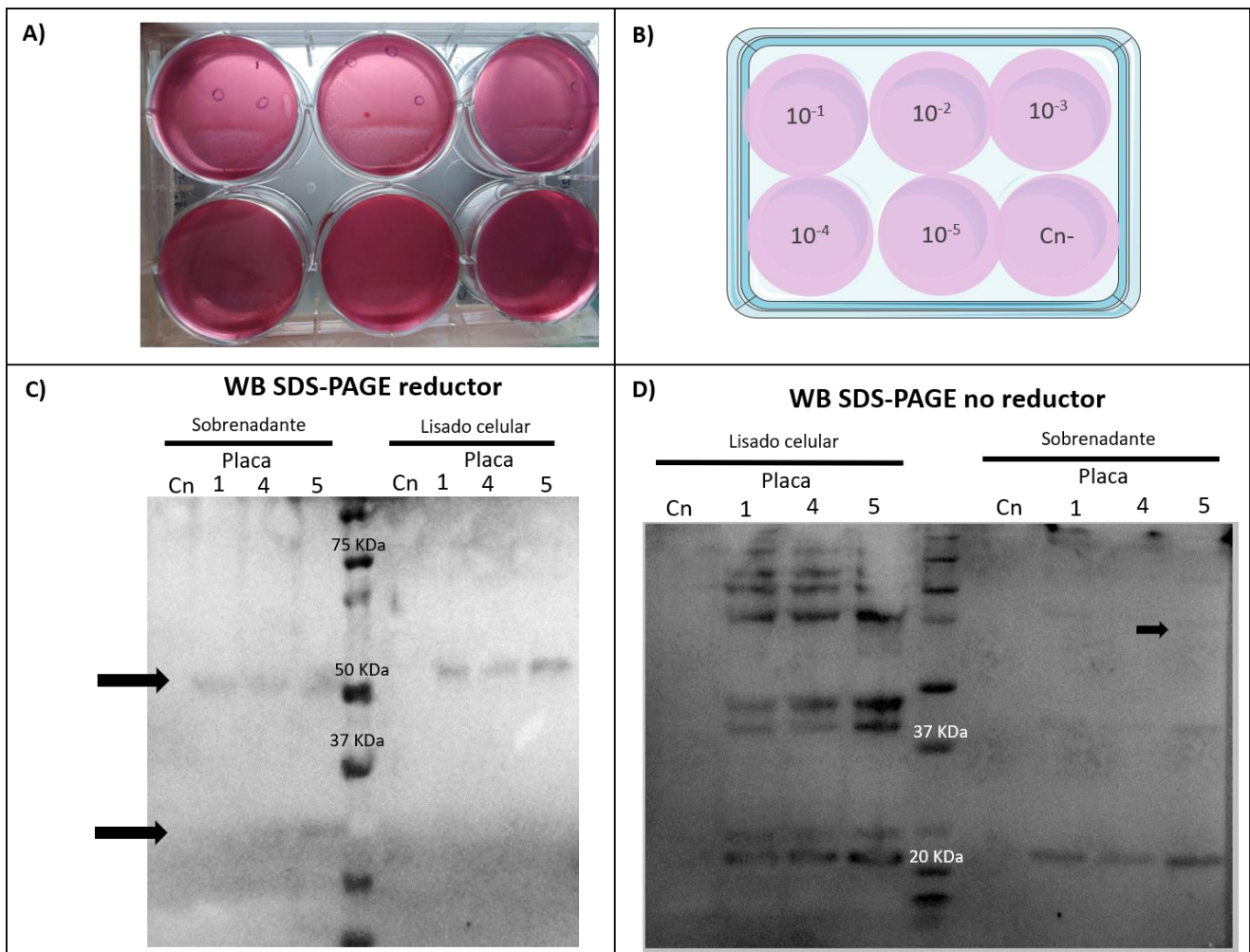


Figura 22. Purificación de placa y expresión del anticuerpo a partir de placa viral. A) Monocapa de células Sf9 infectadas con diluciones décuples de la propagación del baculovirus y teñidas con rojo neutro para la visualización de las placas virales. B) Representación esquemática de las diluciones utilizadas en las infecciones del panel A. C) Western blot de la electroforesis en condiciones reductoras de los lisados celulares y sobrenadantes de las células infectadas con las placas virales. D) Western blot de la electroforesis en condiciones no reductoras de los lisados celulares y sobrenadantes de las células infectadas con las placas virales.

7.7 Titulación del baculovirus recombinante BacEDE1C8 y producción del anticuerpo EDE1C8 en células de insecto

El primer pase del baculovirus purificado de placa fue titulado a través de un ensayo de viabilidad descrito previamente (Mena et al. 2009), basado en la degradación del anillo tetrazólico del MTT por una deshidrogenasa mitocondrial en células viables y la formación de una sal insoluble de formazán de color magenta cuantificable espectrofotométricamente. En la figura 23 se muestra la gráfica con los valores de absorbancia de la titulación, a partir de los cuales se determinó un valor de 6.4×10^8 UFP/ml (panel A de la figura 23). Posteriormente, se infectó un cultivo de 50ml de células Sf9 a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.1 y se obtuvo un segundo pase de trabajo con un título de 3.8×10^8 UFP/ml (panel B de la figura 23), a partir del cual se realizó la infección de las células para la producción del anticuerpo.

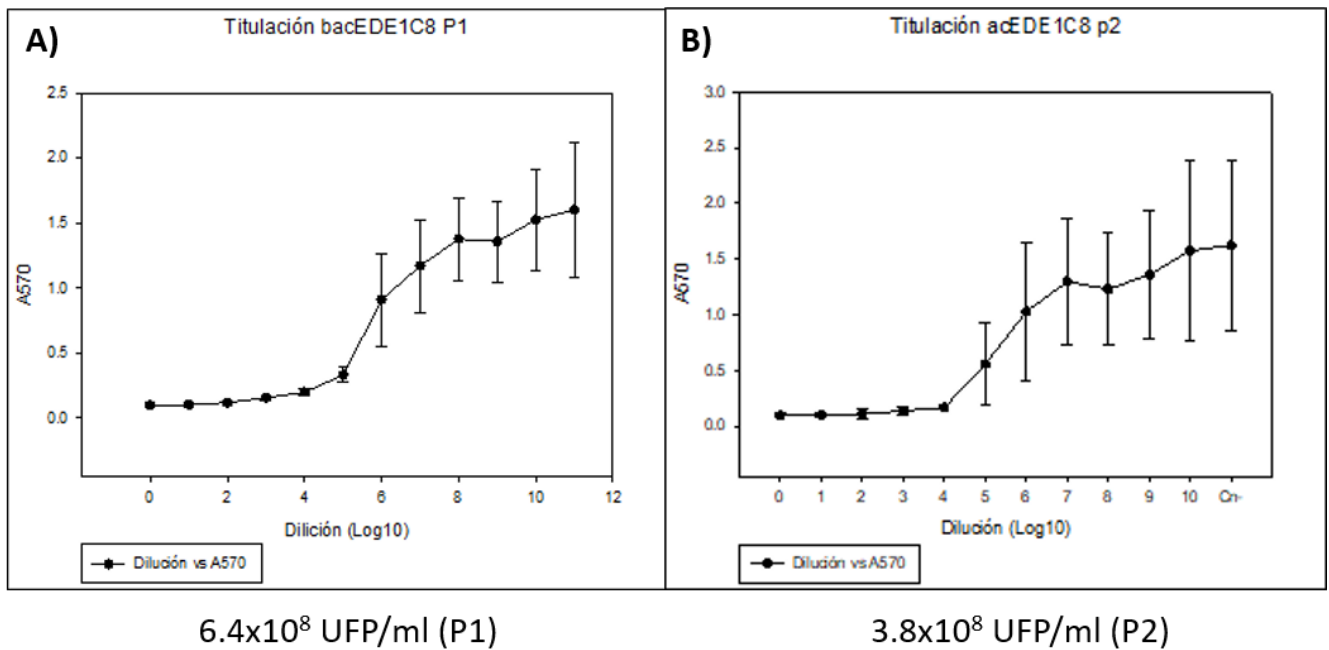


Figura 23. Titulación del baculovirus BacEDE1C8. A) Titulación del baculovirus amplificado de la purificación de placa (P1). B) Titulación del baculovirus amplificado a partir de la infección del cultivo infectado a una MOI de 0.1 con el virus purificado de placa (P2).

Una vez titulado el baculovirus BacEDE1C8, se realizó la producción del anticuerpo EDE1C8 en células de insecto mediante la infección de 2 cultivos en lote de células Sf9 con un volumen de 300ml a una MOI de 1 y se purificó el anticuerpo a partir del clarificado de los sobrenadantes mediante cromatografía de afinidad con proteína A. En la figura 24 se muestra el gel del proceso de purificación del anticuerpo EDE1C8 expresado en células de insecto. En el sobrenadante de las células infectadas, separado en condiciones no reductoras, se puede apreciar una banda de proteína que migra a la altura de la referencia de 250 kDa del marcador (carril 1), la cual desaparece en la fracción no unida a la columna (carril 2) para dar lugar a 2 bandas de un tamaño esperado para las cadenas individuales de un anticuerpo al separar la fracción eluída en presencia de β-mercaptoetanol (carril 4), así como para el tetrámero formado por ambas cadenas (carril 5), al realizar la separación en ausencia del agente reductor.

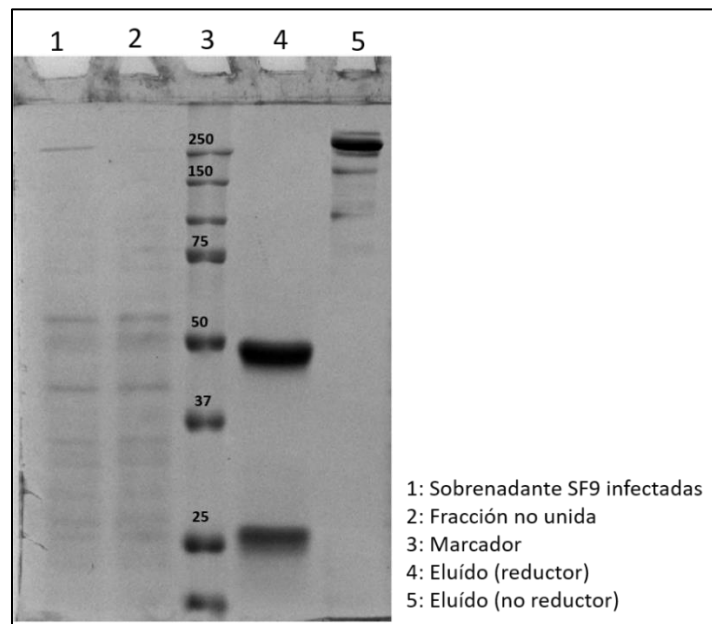


Figura 24. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% del proceso de purificación con proteína A del anticuerpo EDE1C8 expresado en células de insecto de la línea Sf9.

7.8 Evaluación de la funcionalidad del anticuerpo EDE1C8 expresado con el sistema baculovirus-células de insecto

Para determinar si al anticuerpo EDE1C8 expresado en células de insecto se trataba de una molécula funcional, se evaluó la capacidad de reconocer su epítipo en el virión mediante la técnica de *dot blot* y la cepa MR766 del virus del Zika, a la cual se propagó en células C6/36 y se tituló mediante un ensayo en placa con células Vero. En la figura 25 se muestra el resultado del ensayo en placa de la cepa MR766, a partir del cual se obtuvo un título de 1×10^6 unidades formadoras de placa por mililitro. Por su parte, en la figura 26 se presentan los resultados de la evaluación de la capacidad de reconocimiento mediante *dot blot*. En el resultado ilustrado en el panel A se puede apreciar la detección de una señal con el anticuerpo EDE1C8 únicamente en los sitios en donde se colocó el virus del Zika (3×10^5 UFPs) y la ausencia de esta señal en aquellos con el clarificado proveniente del lisado de células sin infectar, indicando un reconocimiento específico y la unión del anticuerpo a su epítipo. Al realizar la prueba para comparar la capacidad de reconocimiento del anticuerpo con respecto al expresado en células CHO, ilustrada en el panel B, se pudo apreciar la detección de una señal débil en los pozos con el lisado de células sin infectar que corresponde a una señal de ruido de fondo, la cual puede ser fácilmente distinguida de las muestras positivas con el virus (5×10^4 UFPs). Como puede apreciarse en este resultado, se observó un comportamiento similar entre los 2 anticuerpos y la detección de una señal positiva con todas las diluciones evaluadas, evidenciando una capacidad de reconocimiento del anticuerpo EDE1C8 expresado en células de insecto equivalente al procedente de células CHO.

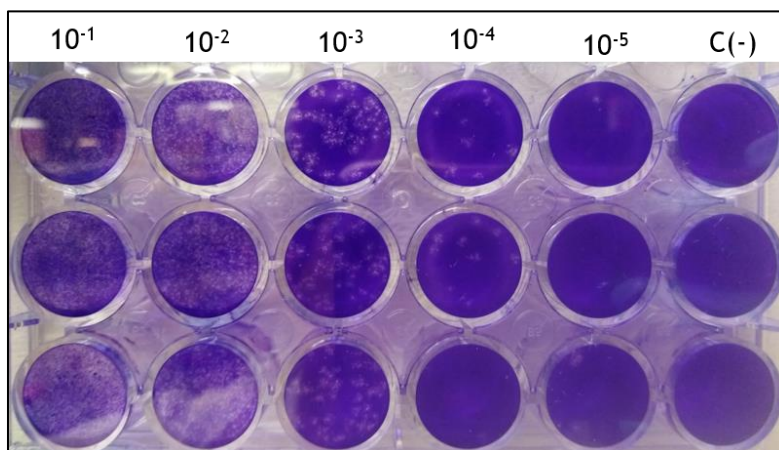


Figura 25. Titulación de la cepa MR766 del virus del Zika mediante ensayo en placa en células Vero.

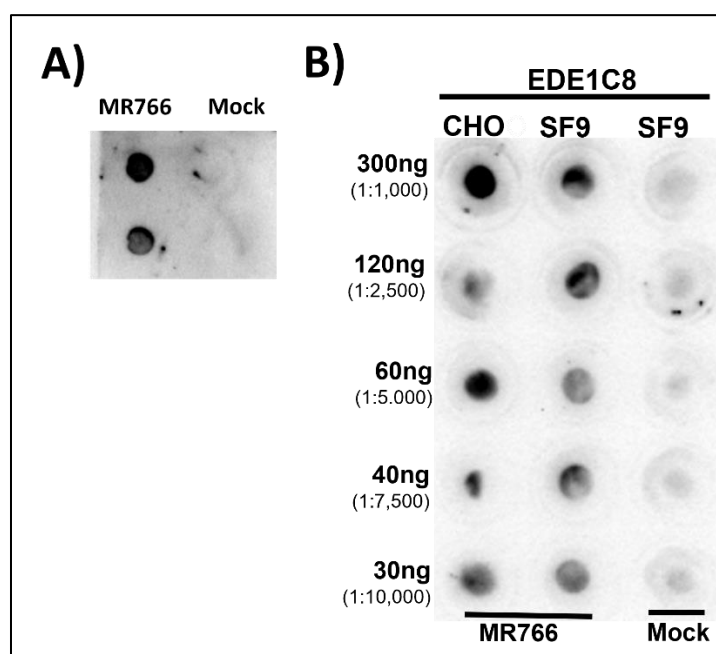


Figura 26. Evaluación de la capacidad de reconocimiento del anticuerpo EDE1C8 expresado con el sistema baculovirus-células de insecto. A) Prueba de dot blot realizada al anticuerpo EDE1C8 expresado en células Sf9 (dilución 1:1000) con la cepa MR766 del virus del Zika (3×10^5 UFPs) y el clarificado proveniente del lisado de células C6/36 sin infectar (Mock). B) Prueba de Dot blot comparativa entre la capacidad de reconocimiento del anticuerpo EDE1C8 expresado en células Sf9 y el expresado en células CHO por su epítipo en la cepa MR766 del virus del Zika (5×10^4 UFPs) realizada a distintas diluciones de los anticuerpos.

7.9 Determinación del patrón de N-glicosilación del anticuerpo EDE1C8 expresado en células de insecto

El anticuerpo EDE1C8 recuperado en la elución de la cromatografía con proteína A del cultivo de células Sf9 se usó para realizar la digestión con PNGasaF de los glicanos de la porción Fc, su marcaje con procainamida y su separación por cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC) acoplada a un lector de masas y determinar el patrón de N-glicosilación del anticuerpo. Adicionalmente, como un control para descartar la presencia de glicanos ajenos al anticuerpo que pudiesen interferir en la determinación del patrón de glicosilación, se realizó un Western blot contra la glicoproteína de envoltura del baculovirus (Anexo III). En la figura 27 se ilustra el cromatograma con las estructuras encontradas en el anticuerpo de uno de los cultivos y en la tabla 17 se presenta un resumen de los

resultados obtenidos de los 2 cultivos, en los cuales se observó una amplia predominancia de glicanos con una estructura paucímanosídica de 3 manosas (64.67%), principalmente en su forma fucosilada (62.53%), seguidos por glicanos del tipo híbrido en un 24.5% y solo un 10% restante de estructuras altas en manosa.

Este perfil de N-glicosilación del anticuerpo EDE1C8 coincide con el reportado por Palmberger para un anticuerpo dirigido al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) expresado en células Sf9 en el cual también se observó una predominancia de glicanos fucosilados con una estructura paucimanosídica de 3 manosas seguida por glicanos híbridos (Palmberger et al. 2011) y asemeja en un menor grado a los patrones descritos por Barbin para un anticuerpo quimérico anti-CD19 expresado en células SF21 con solo la estructura paucimanosídica M3F (Barbin et al. 2006) y por Park para un anticuerpo anti-BSA con abundancia de formas M2F (77.5%) y M3F (12.7%) producido en la hemolinfa de larvas infectadas del gusano de seda (Park et al. 2009).

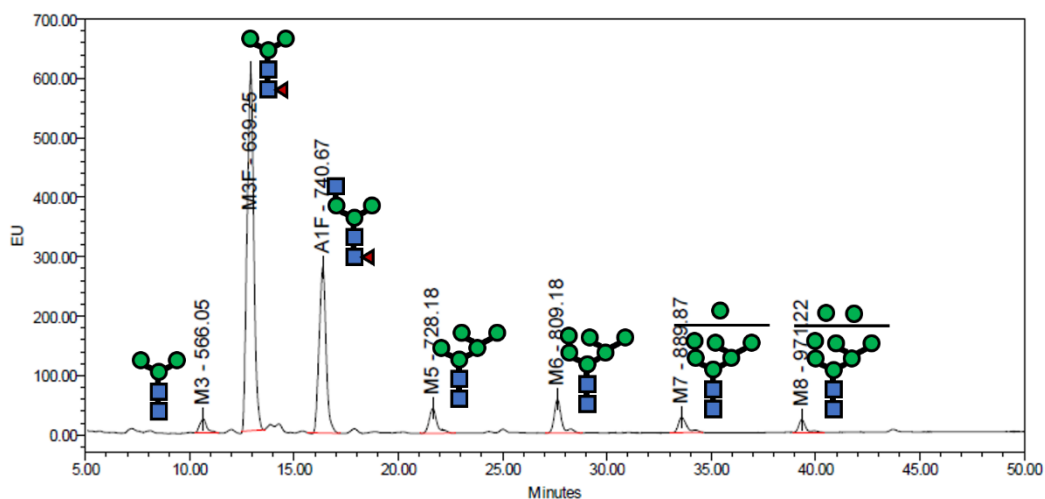


Figura 27. Cromatograma de la determinación del patrón de N-glicosilación del anticuerpo EDE1C8 expresado en células de la línea Sf9.

Tabla 17. Patrón de N-glicosilación del anticuerpo EDE1C8 expresado en células Sf9

Estructura	Porcentaje	Porcentaje por grupo	
M3	2.13	64.67 %	Paucimanosídicos
M3F	62.53		
A1F	24.50	24.50 %	Híbridos
M5	3.81	10.83 %	Altos en manosa
M6	3.97		
M7	1.91		
M8	1.15		

Por otro lado, como se puede apreciar en la figura 28, las formas fucosiladas de los glicanos G0 y G1 observadas de manera predominante en el perfil de N-glicosilación del anticuerpo EDE1C8 expresado en células CHO son asociadas a una baja afinidad de su IgG por la mayoría de los FcγRs, en comparación

con las formas fucosiladas G2 (Jefferis 2012, Li T et al. 2017). Un aspecto importante de considerar del trabajo de Dent y colaboradores es el hecho de que los glicanos del patrón de N-glicosilación nativo de *Nicotiana benthamiana* con residuos de xilosa y fucosa, así como las formas afucosiladas G0 que no mostraron el fenómeno ADE en el modelo de las células k562 son asociados a una baja afinidad por el receptor CD32a, el cual corresponde al único receptor Fc expresado por estas células (Figura 29, Dent et al. 2016). De manera similar, los glicanos paucimanosídicos también han sido asociados a una baja afinidad del anticuerpo por la mayoría de los FcγRs. (Figura 28, Cymer et al. 2017, Mimura et al. 2001). Sin embargo, a pesar de que el receptor CD32a ha sido identificado como el receptor más permisivo al fenómeno ADE en los *Flavivirus* (Rodrigo et al. 2006, Moi et al. 2010, Puerta-Guardo et al. 2010, Boonnak et al. 2008, Kou et al. 2008), a partir del estudio de otros virus se sabe que todos los FcγRs tienen el potencial de mediar el fenómeno (Taylor et al. 2015, Kam et al. 2007, Sapinoro et al. 2008, Rodrigo et al. 2006), por lo cual la relación entre una baja afinidad por CD32a y la ausencia de ADE debe ser interpretada con precaución, sobre todo cuando se desea extrapolar los resultados reportados *in vitro* a partir de una línea como las células k562, que solo expresan este receptor, a una situación *in vivo*.

A pesar de la evidencia del fenómeno ADE y una mayor viremia en primates no humanos (Halstead 1979, Goncalvez et al. 2007, George et al. 2017), se ha observado que en el caso del síndrome congénito asociado al virus del Zika existe una relación con un estado de desnutrición (Barbeito-Andrés et al. 2020) y que en los cuadros de mayor severidad ocasionados por el virus del Dengue, el síndrome de permeabilidad vascular no corresponde temporalmente con la etapa de mayor viremia, sino con el periodo de disminución de la fiebre (defervescencia) de la enfermedad, de manera que las teorías más recientes que han surgido para explicar los cuadros de mayor severidad incluyen una toxicosis viral mediada por la proteína NS1 del virus y un síndrome de linfocitosis hemofagocítica o HLH (Halstead 2019). No obstante, recientemente se ha identificado evidencia clínica que involucra la preexistencia de anticuerpos afucosilados reactivos a los *Flavivirus* como un gran factor de riesgo para el desarrollo de los cuadros severos (Wang TT et al. 2017, Thulin et al. 2020).

Un rasgo particular de los anticuerpos afucosilados de tipo complejo es su alta afinidad hacia el receptor CD16a sin cambios significativos en su afinidad por CD32a y CD32b (Li T et al. 2017, Patel et al. 2019). Aunque algunos autores han asociado los glicanos paucimanosídicos con una menor afinidad de su IgG por la mayoría de los receptores Fc (Figura 28, Cymer et al. 2017, Mimura et al. 2001) una característica importante que se ha observado cuando son producidos anticuerpos en células de insecto, ya sea que se trate de anticuerpos carentes de fucosa producidos en la glándula de la seda de larvas infectadas del gusano *Bombix mori* (Tada et al. 2015) o de anticuerpos fucosilados con un patrón de N-glicosilación como al encontrado en el presente estudio para el anticuerpo EDE1C8 producido en células Sf9, es que no solo son capaces de unirse a los FcγRs, sino que presentan una alta afinidad por CD16a y una mayor actividad ADCC que los mismos anticuerpos expresados en células de mamífero (Palmerberger et al. 2011, Barbin et al. 2006, Shen et al. 2009, Hu et al. 1995).

	C1q	CD64	CD32a ND	CD32a R131	CD32a H131	CD32b	CD16a	CD16a V158	CD16a F158	CD16b
	Grey	Grey	Green	Green	Orange	Green	Green	Green	Green	Green
	Orange	Orange	Orange	Orange	White	Orange	Orange	Orange	White	White
	Green	Orange	White	Orange	White	Orange	White	Orange	White	White
	Orange	Grey	White	Green	White	Green	Green	Green	White	Green
	White	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange
	Grey	White	White	White	Orange	White	White	Green	Green	White
	White	Orange	White	Orange	White	Orange	White	Orange	White	White

Figura 28. Relación de los glicanos de la porción Fc de los anticuerpos con la afinidad por los diferentes receptores Fcγ. Las casillas en color verde indican una elevada afinidad de la IgG con glicanos como el ilustrado en el extremo izquierdo de su fila para el receptor correspondiente mostrado en la parte superior. Las casillas en color naranja indican una baja afinidad, las grises una tendencia sin cambios en la afinidad. Flechas rojas, glicanos de mayor abundancia en el anticuerpo EDE1C8 expresado en células CHO. Flecha verde, principal glicano observado en el anticuerpo EDE1C8 expresado en las células de insecto Sf9. WT, glicano más abundante encontrado en anticuerpos expresados en *N. benthamiana* con un patrón de N-glicosilación *wild type*; ΔXF principal estructura de glicano del anticuerpo expresado en la línea de *N. benthamiana* carente de residuos de xilosa y fucosa reportada por Dent y colaboradores. Adaptado de Cymer F, et al. (2017), Mimura Y, et al. (2001) y Dent M, et al. (2016).

	CD64	CD32a	CD32b	CD32c	CD16a	CD16b
K562		+			-	
U937	+	+**			-	
THP-1	+	+			-	
	↓	↓	↓	ND	↓	ND
	≈G1F	↑>G1F	↑G1F	ND	↑G1F	↑G1F
	↓<CHO	↓<CHO	↓<CHO	↓<CHO	↓<CHO	↓<CHO
	ND	↓<CHO			↑>CHO	↑>CHO

Figura 29. Expresión de receptores Fcγ en las líneas celulares utilizadas para evaluar el fenómeno ADE y relación de los glicanos de la porción Fc con la afinidad por los receptores Fcγ. Parte superior, receptores Fcγ expresados en las líneas K562, U937 y THP-1. Parte inferior, afinidad de las IgGs con glicanos carentes de galactosa terminal (G0), monogalactosilados (G1), bigalactosilados (G2) y los reportados por Dent y colaboradores en el anticuerpo con ausencia de fenómeno ADE. WT, wild type; ΔXF, línea de *N. benthamiana* deficiente en xilosa y fucosa; ** expresión inducible; ND, no determinado. Adaptado de Khandia R, et al. (2018). Patel KR, et al. (2019), Reusch D & Tejada ML. (2015) y Dent M, et al. (2016).

Aunque la presencia de anticuerpos reactivos no neutralizantes es considerada el mayor factor de riesgo para el desarrollo de los cuadros severos causados por el virus del Dengue, solo un porcentaje de las infecciones que ocurren en presencia de anticuerpos reactivos no neutralizantes progresan a cuadros severos con el síndrome de permeabilidad vascular. En años recientes, Wang y colaboradores identificaron a partir de una cohorte de pacientes hospitalizados seropositivos al virus del Dengue que aquellos pacientes que presentaban un incremento en el porcentaje de anticuerpos afucosilados dirigidos a la proteína E por encima de un 10% progresaron a un cuadro severo y desarrollaron trombocitopenia (Wang TT et al. 2017). Mas recientemente Thulin y colaboradores no solo observaron que únicamente un porcentaje de afucosilación mayor al 10% en los anticuerpos dirigidos a la proteína E presentes en el suero de las madres seropositivas era capaz de predecir una manifestación clínica en sus neonatos con un valor predictivo del 88% y especificidad del 93%, sino que diversos anticuerpos monoclonales dirigidos a la proteína E, incluyendo algunos anticuerpos neutralizantes dirigidos a epítomos EDE, al expresarse en una forma afucosilada provocaron un mayor incremento en el porcentaje de infección en células CD32a+ CD16a+ en comparación con el provocado por las formas fucosiladas de los mismos anticuerpos y el inducido por los anticuerpos afucosilados en células CD32a+ CD16-, evidenciando una sinergia en el fenómeno ADE mediado por ambos receptores ante la presencia de anticuerpos afucosilados (Thulin et al. 2020). Debido a que este tipo de anticuerpos puede inducir una mayor fagocitosis en monocitos primarios CD16+ comparados con su contraparte con presencia de fucosa es posible que esta vía este involucrada en la sinergia del fenómeno ADE (Herter et al. 2014). Es importante destacar que la mayor afinidad de los anticuerpos afucosilados hacia al receptor CD16a, se atribuye, al menos para anticuerpos con glicanos de tipo complejo a una menor movilidad del glicano unido en la posición 162 del receptor y a una unión resultante de mayor estabilidad entre el receptor y la porción Fc del anticuerpo (Sakae et al. 2017, Li W et al. 2017), sin embargo, se desconoce si el impedimento estérico en el que participa el residuo de fucosa que lleva a una mayor movilidad del glicano en CD16a y a una unión de menor estabilidad tiene lugar con los anticuerpos expresados en células de insecto, lo cual resulta interesante debido a que en el patrón de N-glicosilación determinado en el presente estudio para el anticuerpo EDE1C8 expresado en células Sf9 se apreció un porcentaje de afucosilación con un valor mayor a un 10% y debido a que al momento de realización de este estudio no se encontraron estructuras de la porción Fc de anticuerpos expresados en células de insecto con la presencia o ausencia de fucosa depositadas en el Protein Data Bank.

Debido no solo al reconocimiento de la mayor afinidad de los anticuerpos afucosilados y la de los anticuerpos expresados en células de insecto por el receptor CD16a, sino a la identificación de los monocitos CD16(+) como la principal población de células responsable de mediar el fenómeno ADE y la de mayor susceptibilidad a la infección por *Flavivirus* durante la primoinfección entre las células mononucleares de sangre periférica (Li et al. 2018, Michlmayr et al. 2017), a que se ha observado un incremento de monocitos asociado a la disminución en el número de plaquetas en pacientes con dengue (Tsai et al. 2017), así como a una expansión en la población de monocitos CD16(+) observada posteriormente a la infección con el virus del Zika (Michlmayr et al. 2017, Ayala-Nunez et al. 2019), es importante que futuros esfuerzos destinados a una mayor comprensión de la inmunopatología de los *Flavivirus* y el desarrollo de candidatos terapéuticos a partir de anticuerpos en los que se ha reportado una alta actividad neutralizante, tales como los anticuerpos dirigidos a los epítomos del dímero de la proteína de envoltura y el anticuerpo EDE1C8 expresado con el sistema baculovirus del presente estudio, sean encaminados a caracterizar los complejos inmunes con capacidad infecciosa formados por anticuerpos con distintos glicanos con fucosa y carentes de la misma, incluyendo el tamaño de los

complejos y su capacidad neutralizante o infectiva en células que coexpresen de manera simultánea diferentes tipos de FcγRs, incluyendo CD16. En este mismo sentido, debido a ejemplos de anticuerpos neutralizantes que exhiben ADE aun a elevadas concentraciones, presumiblemente como consecuencia de una incapacidad para mantener una alta afinidad por su epítipo bajo las condiciones ácidas del interior de los fagosomas (Heinz & Stiasny. 2017), es importante realizar la evaluación de la capacidad neutralizante de los anticuerpos con potencial terapéutico en células con capacidad fagocítica susceptibles a la infección viral (susceptibilidad que es conferida por la presencia de las lectinas CD206 y CD209) como ha sido sugerido por algunos autores (Rey et al. 2018), y no solo en células carentes de FcγRs.

8. CONCLUSIONES

Los miembros del género *Flavivirus* representan un problema importante de salud pública debido a sus recientes epidemias y al incremento en la distribución de sus mosquitos vectores derivado de los fenómenos de cambio climático (Inizan et al. 2021, Ryan et al. 2019). Por esta razón, así como antecedentes que involucraban la expresión de diversos anticuerpos con el sistema baculovirus y que reportaban el potencial terapéutico de los anticuerpos dirigidos a epítopos del dímero de la proteína de envoltura. en el presente trabajo se exploró el potencial del sistema baculovirus-células de insecto para expresar un anticuerpo recombinante dirigido a uno de estos epítopos.

En este trabajo se logró la expresión adecuada del anticuerpo EDE1C8 en células de insecto a través del sistema baculovirus, el cual exhibió un patrón de N-glicosilación de acuerdo con lo reportado a la literatura para otros anticuerpos expresados en células de insecto y mantuvo una capacidad de reconocimiento de su epítipo en el virión de la cepa MR766 del virus del Zika similar a la de su anticuerpo parental expresado en células CHO evaluada mediante *dot blot*.

El presente estudio contribuye como un antecedente para el desarrollo de anticuerpos con potencial terapéutico contra los *Flavivirus* del Zika y Dengue, así como para estudios próximos encaminados a dilucidar la relación existente entre el patrón de N-glicosilación de los anticuerpos y los cuadros de mayor severidad ocasionados por los *Flavivirus* y una mayor comprensión del estado del arte de la inmunopatología de las enfermedades causadas por estos virus.

9. PERSPECTIVAS

Evaluar la capacidad del anticuerpo EDE1C8 expresado en células de insecto y en células CHO de formar complejos inmunes infecciosos con el virus y su capacidad de mediar el fenómeno ADE en células con diferentes receptores de la fracción Fc.

Evaluar la actividad neutralizante del anticuerpo EDE1C8 expresado en células de insecto y células CHO en modelos de células susceptibles que expresan receptores del fragmento Fc.

Evaluar *in vitro* la activación de las células del sistema mononuclear fagocítico con el anticuerpo EDE1C8 expresado en ambos sistemas y el papel de los diferentes receptores de la fracción Fc de las inmunoglobulinas G (FcγRs) en un modelo *in vivo* de la infección con los virus del Dengue y Zika.

10. REFERENCIAS

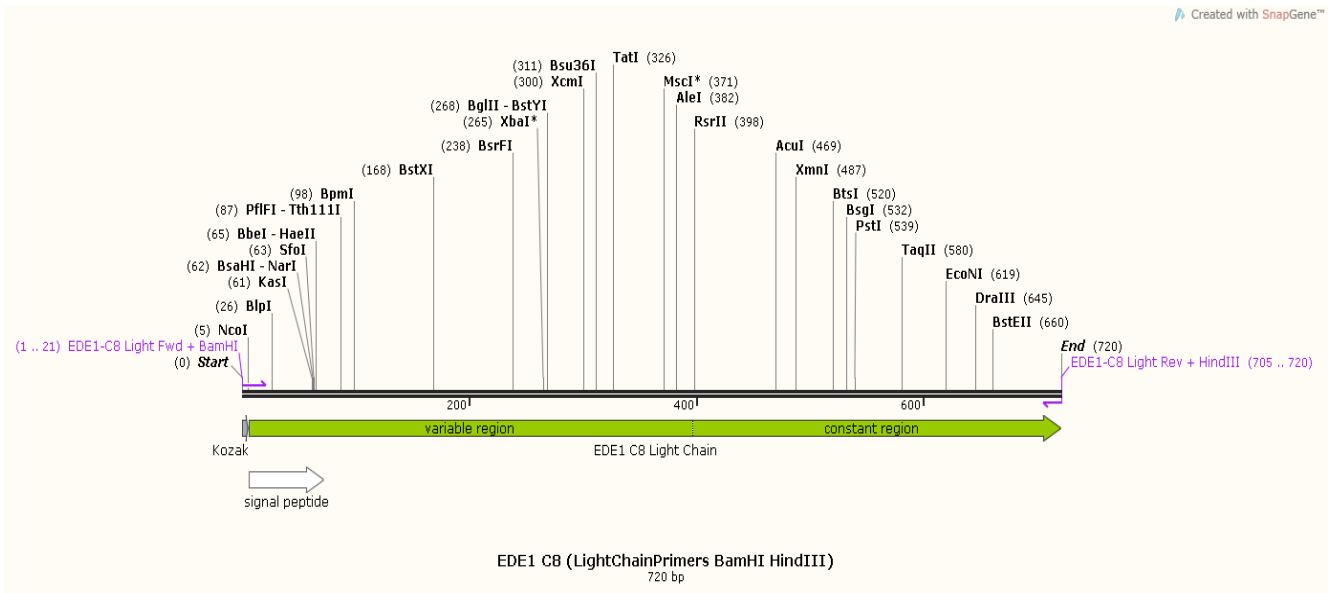
- Amara A & Mercer J. (2015). Viral apoptotic mimicry. *Nat Rev Microbiol.* 13(8):461-9
- Ayala-Nunez NV, et al. (2016). How antibodies alter the cell entry pathway of dengue virus particles in macrophages. *Sci Rep.* 6:28768
- Ayala-Nunez NV, et al. (2019). Zika virus enhances monocyte adhesion and transmigration favoring viral dissemination to neural cells. *Nat Commun.* 10(1):4430
- Aye KS, et al. (2014). Pathologic highlights of dengue hemorrhagic fever in 13 autopsy cases from Myanmar. *Hum Pathol.* 45(6):1221-33
- Bantleon F, et al. (2016). Human IgE is efficiently produced in glycosylated and biologically active form in lepidopteran cells. *Mol Immunol.* 72:49-56
- Barba-Spaeth G, et al. (2016). Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization. *Nature.* 536(7614):48-53
- Barbeito-Andrés J, et al (2020). Congenital Zika syndrome is associated with maternal protein malnutrition. *Sci Adv.* 6(2):eaaw6284
- Barbin K, et al. (2006). Influence of variable N-glycosylation on the cytolytic potential of chimeric CD19 antibodies. *J Immunother.* 29(2):122-33
- Bardina SV, et al. (2017). Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting antinflavivirus immunity. *Science.* 356(6334):175-180
- Betenbaugh MJ, et al (2004). Biosynthesis of human-type N-glycans in heterologous systems. *Curr Opin Struct Biol.* 14(5):601-6
- Boonnak K, et al. (2008). Role of dendritic cells in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Virol.* 82(8):3939-51
- Boonnak K, et al. (2011). Cell type specificity and host genetic polymorphisms influence antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Virol.* 85(4):1671-83
- Boonnak K, et al. (2013). Human FcγRII cytoplasmic domains differentially influence antibody-mediated dengue virus infection. *J Immunol.* 190(11):5659-65
- Carbaugh DL & Lazear HM. (2020). Flavivirus Envelope Protein Glycosylation: Impacts on Viral Infection and Pathogenesis. *J Virol.* 94(11):e00104-20
- Cérutti M & Golay J. (2012). Lepidopteran cells, an alternative for the production of recombinant antibodies? *MAbs.* ;4(3):294-309
- Chambers et al. (1990). Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol.* 44(1):649-688.
- Chan CE, et al. (2010). Optimized expression of full-length IgG1 antibody in a common *E. coli* strain. *PLoS One.* 5(4):e10261
- Chau TN, et al. (2009). Dengue virus infections and maternal antibody decay in a prospective birth cohort study of Vietnamese infants. *J Infect Dis.* 200(12):1893-900
- Chen Q. (2016). Glycoengineering of plants yields glycoproteins with polysialylation and other defined N-glycoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113(34):9404-6.
- Chen YY, et al (2020). Construction of polycistronic baculovirus surface display vectors to express the PCV2 Cap(d41) protein and analysis of its immunogenicity in mice and swine. *Vet Res.* 51(1):112
- Crawford F, et al. (2004). Mimotopes for alloreactive and conventional T cells in a peptide-MHC display library. *PLoS Biol.* 2(4):E90.
- Cruz-Oliveira C, et al. (2015). Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiol Rev.* 39(2):155-70
- Cymer F, et al. (2017). Therapeutic monoclonal antibody N-glycosylation-structure, function and therapeutic potential. *Biologicals.* 52:1-11
- Dejnirattisai W, et al. (2015). A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus. *Nat Immunol.* 16(2):170-177
- Dejnirattisai et al. (2016). Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with Zika virus. *Nat Immunol.* 17(9):1102-1108.
- Dent M et al. (2016). Plant-produced anti-dengue virus monoclonal antibodies exhibit reduced antibody-dependent enhancement of infection activity. *J Gen Virol.* 97(12):3280-3290
- Domingo E, et al. (2000). Cuasiespecies y evolución molecular de virus. *Rev sci tech*
- Dowd KA & Pierson TC. (2011). Antibody-mediated neutralization of flaviviruses; a reductionist view. *Virology.* 411(2):306-315
- Durbin AP, et al. (2008). Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. *Virology.* 376(2):429-35
- Dussupt V, et al. (2021). Landscape of Monoclonal Antibodies Targeting Zika and Dengue: Therapeutic Solutions and Critical Insights for Vaccine Development. *Front Immunol.* 11:621043
- Edelman L, et al. (1997). Obtaining a functional recombinant anti-rhesus (D) antibody using the baculovirus-insect cell expression system. *Immunology.* 91(1):13-9
- Fernández E, et al. (2017). Anti-Dengue E-dimer epitope human antibodies have therapeutic activity against Zika virus infection. *Nat Immunol.* 18(11):1261-1269
- Flipse J, et al. (2013). Molecular mechanisms involved in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in humans. *Traffic.* 14(1):25-35.
- Fontes-Garfias CR, et al (2017). Functional Analysis of Glycosylation of Zika Virus Envelope Protein. *Cell Rep.* 21(5):1180-1190
- Futatsumori-Sagai M & Tsumoto K. (2010). Signal peptide design for improving recombinant protein secretion in the baculovirus expression vector system. *Biochem Biophys Res Commun.* 391(1):931-5
- Geisler C, et al. (2015). An overview and history of glyco-engineering in insect expression systems. *Glyco-Engineering: Methods and Protocols.* 1321:131-152
- George J, et al. (2017). Prior Exposure to Zika Virus Significantly Enhances Peak Dengue-2 Viremia in Rhesus Macaques. *Sci Rep.* 7(1):10498
- Gollins SW & Porterfield JS. (1985). Flavivirus infection enhancement in macrophages: an electron microscopic study of viral cellular entry. *J Gen Virol.* 66 (Pt 9):1969-82
- Goncalvez AP, et al (2007). Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection in vitro and in vivo and strategies for prevention. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(22):9422-7

- Guzman MG, et al (2013). Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol.* 158(7):1445-59.
- Guy B, et al. (2004). Evaluation by flow cytometry of antibody-dependent enhancement (ADE) of dengue infection by sera from Thai children immunized with a live-attenuated tetravalent dengue vaccine. *Vaccine.* 22(27-28):3563-74
- Hackett BA & Cherry S. (2018). Flavivirus internalization is regulated by a size-dependent endocytic pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 115(16):4246-4251
- Halstead SB, (1979). In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. *J Infect Dis.* 140(4):527-33
- Halstead SB, et al. (1980). Enhancement of dengue virus infection in monocytes by flavivirus antisera. *Am J Trop Med.* 29(4):638-642
- Halstead SB, (2002). Dengue. *Curr Opin Infect Dis.* 15(5):471-6
- Halstead SB, et al. (2010). Intrinsic antibody-dependent enhancement of microbial infection in macrophages: disease regulation by immune complexes. *Lancet Infect Dis.* 10(10):712-22
- Halstead SB. (2014). Dengue antibody-dependent enhancement: knowns and unknowns. *Microbiol Spectr.* 2(6).
- Halstead SB. (2019). Recent advances in understanding dengue. *F1000Res.* 8:F1000 Faculty Rev-1279
- Hamel R, et al. (2015). Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol.* 89(17):8880-96
- Hasan SS, et al (2018). Structural Biology of Zika virus and other flaviviruses. *Nat Struct Mol Biol.* 25(1):13-20
- Hasemann CA & Capra JD (1990). High-level production of a functional immunoglobulin heterodimer in a baculovirus expression system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(10):3942-6
- Hawkes RA (1964). Enhancement of the infectivity of arboviruses by specific antisera produced in domestic fowls. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 42:465-82
- Haase S, et al (2013). Genetic Engineering of Baculoviruses. In Romanovski V, *Current Issues in Molecular Virology Viral Genetics and Biotechnological Applications.*
- Heinz FX & Stiasny K. (2017). The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 81(1):e00055-16
- Herter S, et al. (2014). Glycoengineering of therapeutic antibodies enhances monocyte/macrophage-mediated phagocytosis and cytotoxicity. *J Immunol.* 192(5):2252-60
- Hilton HG, et al. (2015). The production of KIR-Fc fusion proteins and their use in a multiplex HLA class 1 binding assay. *J Immunol Methods.* 425:79-87.
- Hsu TA, et al. (1994). Effects of co-expressing chaperone BiP on functional antibody production in the baculovirus system. *Protein Expr Purif.* 5(6):595-603.
- Hsu TA, et al. (1997). Differential N-glycan patterns of secreted and intracellular IgG produced in *Trichoplusia ni* cells. *J Biol Chem.* 272(14):9062-70.
- Hu P, et al. (1995). A human-mouse chimeric Lym-1 monoclonal antibody with specificity for human lymphomas expressed in a baculovirus system. *Hum Antibodies Hybridomas.* 6(2):57-67.
- Huang KJ, et al. (2005). Flow cytometry determination for dengue virus infected cells, its application for antibody dependent enhancement. *Dengue Bulletin*
- Inizan C, et al. (2021). Viral evolution sustains a dengue outbreak of enhanced severity. *Emerg Microbes Infect.* 10(1):536-544.
- Jefferis R. (2012). Isotype and glycoform selection for antibody therapeutics. *Arch Biochem Biophys.* 526(2):159-166.
- Jessie K, et al. (2004). Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis.* 189(8):1411-8
- Jiang XR et al. (2011). Advances in the assessment and control of the effector functions of therapeutic antibodies. *Nat Rev Drug Discov.* 10(2):101-111.
- Jin Y, et al. (2017). Human monoclonal antibodies as candidate therapeutics against emerging viruses. *Front Med.*
- Johansson DX, et al. (2007). Efficient expression of recombinant human monoclonal antibodies in *Drosophila* S2 cells. *J Immunol Methods.* 318(1-2):37-46.
- Jordan KR, et al. (2008). Baculovirus-infected insect cells expressing peptide-MHC complexes elicit protective antitumor immunity. *J Immunol.* 180(1):188-97.
- Kam YW, et al. (2007). Antibodies against trimeric S glycoprotein protect hamsters against SARS-CoV challenge despite their capacity to mediate FcγRII-dependent entry into B cells in vitro. *Vaccine.* 25(4):729-40
- Khandia R, et al. (2018). Modulation of Dengue/Zika Virus Pathogenicity by Antibody-Dependent Enhancement and Strategies to Protect Against Enhancement in Zika Virus Infection. *Front Immunol.* 9:597
- Kliks SC, et al. (1988). Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am J Trop Med Hyg.* 38(2):411-9
- Kollewe C & Vilcinskis A. (2013). Production of Recombinant Proteins in Insect Cells. *Am J Biochem Biotechnol.* 9 (3): 255-271
- Kostyuchenko VA, et al. (2016). Structure of thermally stable Zika virus. *Nature.* 533(7603):425-428
- Kou Z, et al (2008). Monocytes, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus (DV) infection among human peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol.* 80(1):134-46
- Kozono H, et al. (1994). Production of soluble MHC class II proteins with covalently bound single peptides. *Nature.* 369(6476):151-4
- Laureti M, et al. (2018). Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. *Front Immunol.* 9:2180
- Lee JK & Shin O.S. (2019). Advances in Zika Virus-Host Cell Interaction: Current Knowledge and Future Perspectives. 20(5):1101
- Li M, et al. (2018). Dengue immune sera enhance Zika virus infection in human peripheral blood monocytes through Fc gamma receptors. *PLoS One.* 13(7):e0200478
- Li T, et al. (2017). Modulating IgG effector function by Fc glycan engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114(13):3485-3490.
- Li W, et al. (2017). Crystallizable Fragment Glycoengineering for Therapeutic Antibodies Development. *Front Immunol.* 8:1554

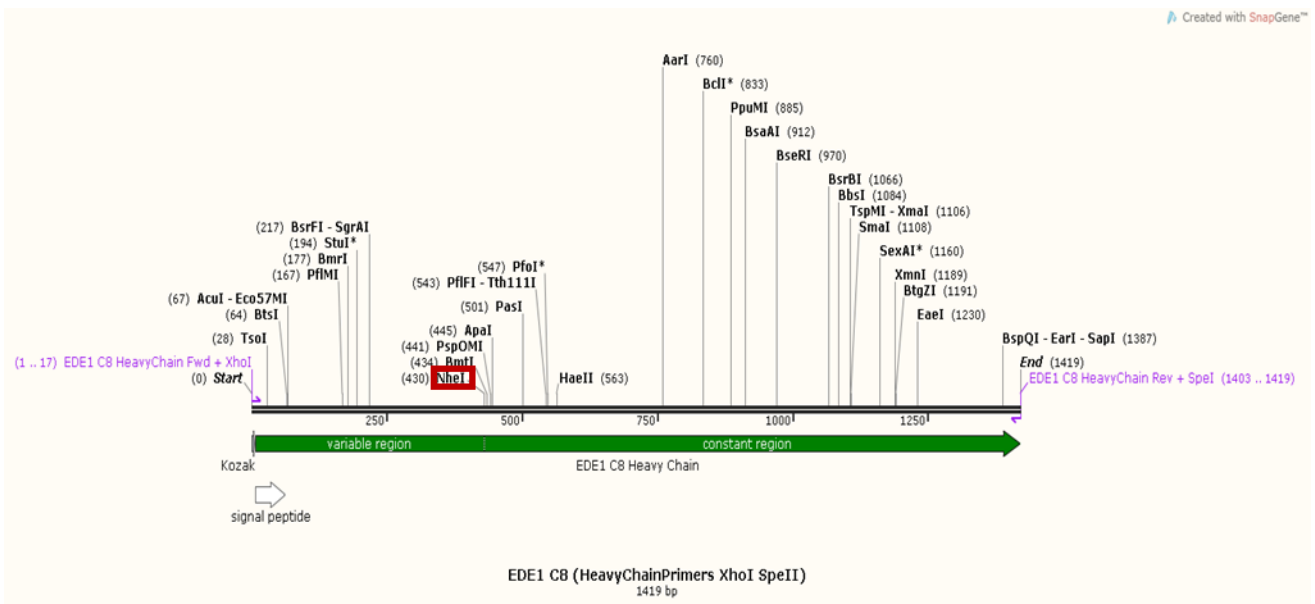
- Liang M, et al. (1997). Baculovirus expression of a human G2-specific, neutralizing IgG monoclonal antibody to Puumala virus. *Virology*. 235(2):252-60.
- Liu H, et al. (2007). Characterization of lower molecular weight artifact bands of recombinant monoclonal IgG1 antibodies on non-reducing SDS-PAGE. *Biotechnol Lett*. 29(11):1611-22.
- Luo D, et al. (2020). Baculovirus Surface Display of Zika Virus Envelope Protein Protects against Virus Challenge in Mouse Model. *Virology*. 35(5):637-650.
- Magnani DM, et al (2017). Neutralizing human monoclonal antibodies prevent Zika virus infection in macaques. *Sci Transl Med*. 9(410):eaan8184
- Magnani DM, et al. (2018). Fetal demise and failed antibody therapy during Zika virus infection of pregnant macaques. *Nat Commun*. 9(1):1624
- Mahesh G, et al (2018). Cloning, Expression, Purification and Characterization of Oligomeric States of the Native 5HT2A G-Protein-Coupled Receptor. *Protein Pept Lett*. 25(4):390-397
- Medina & Medina-Montoya. (2017). New spectrum of neurologic consequences of Zika. *J Neurol Sci*. 383:214-215
- Mena JA, et al. (2003). Titration of non-occluded baculovirus using a cell viability assay. *Biotechniques*. 34(2):260-2, 264
- Michlmayr D, et al (2017). CD14 + CD16 + monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua. *Nat Microbiol*. 2(11):1462-1470
- Mimura Y, et al. (2001). Role of oligosaccharide residues of IgG1-Fc in Fc gamma RIIB binding. *J Biol Chem*. 276(49):45539-47.
- Moi ML, et al. (2010). Involvement of the Fc gamma receptor IIA cytoplasmic domain in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Gen Virol*. 91(Pt 1):103-11
- Mora N & Rosales C. (2009) Funciones de los receptores Fc en mecanismos de defensa y regulación inmunológica. *Rev Invest Clin*. 61(4):313-326
- Mukhopadhyay S, et al. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*. 3(1):13-22.
- Pagani G, et al. (2020). Imported dengue fever: a 16-years retrospective analysis in Milan (Italy) and a brief review of the European literature. *Infez Med*. 28(2):243-252
- Palmberger D, et al. (2011). Insect cells for antibody production: evaluation of an efficient alternative. *J Biotechnol*.153(3-4):160-6
- Palomares LA, et al. (2015). An overview of cell culture engineering for the insect cell-baculovirus expression vector system (BEVS).
- Palomares LA, et al. (2018). Glycobiotechnology of the insect cell-baculovirus expression system technology. *Adv Biochem Eng Biotechnol*.
- Park EY, et al. (2009). Human IgG1 expression in silkworm larval hemolymph using BmNPV bacmids and its N-linked glycan structure. *J Biotechnol*. 139(1):108-14
- Patel KR, et al. (2019). Multiple Variables at the Leukocyte Cell Surface Impact Fc γ Receptor-Dependent Mechanisms. *Front Immunol*. 10:223
- Pierson TC, et al. (2007). The stoichiometry of antibody-mediated neutralization and enhancement of West Nile virus infection. *Cell Host Microbe*. 1(2):135-45
- Pierson TC & Diamond MS. (2016). Flaviviruses. In *Fields Virology*. pp747-795
- Pierson TC & Diamond MS (2018). The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. *Nature*. 560(7720):573-581
- Pokidysheva E, et al (2006). Cryo-EM reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. *Cell*. 124(3):485-93.
- Priyamvada L, et al. (2016). Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 113(28):7852-7
- Puerta-Guardo H, et al. (2010). Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in U937 cells requires cholesterol-rich membrane microdomains. *J Gen Virol*. 91(Pt 2):394-403.
- Puerta-Guardo H, et al. (2013). The cytokine response of U937-derived macrophages infected through antibody-dependent enhancement of dengue virus disrupts cell apical-junction complexes and increases vascular permeability. *J Virol*. 87(13):7486-501
- Raju TS. (2008). Terminal sugars of Fc glycans influence effector functions of IgGs. *Curr Opin Immunol*. 20(4):471-478.
- Reusch D & Tejada ML. (2015). Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes. *Glycobiology*. 25(12):1325-34
- Rey FA, et al. (2018). The bright and the dark side of human antibody responses to flaviviruses: lessons for vaccine design. *EMBO Rep*. 19(2):206-224
- Robinson MP, et al. (2015). Efficient expression of full-length antibodies in the cytoplasm of engineered bacteria. *Nat Commun*. 6:8072
- Rodrigo WW, et al (2006). Differential enhancement of dengue virus immune complex infectivity mediated by signaling-competent and signaling-incompetent human Fc gamma RIA (CD64) or Fc gamma RIIA (CD32). *J Virol*. 80(20):10128-38
- Rohrmann GF (2019). The baculovirus replication cycle: Effects on cells and insects. In *Baculovirus Molecular Biology*. 4e. pp57-83.
- Rouvinski A, et al (2015). Recognition determinants of broadly neutralizing human antibodies against dengue viruses. *Nature*. 520(7545):109-13
- Ryan SJ, et al. (2019). Global expansion and redistribution of Aedes-borne virus transmission risk with climate change. *PLoS Negl Trop Dis*. 13(3):e0007213
- Sakae Y, et al. (2017). Conformational effects of N-glycan core fucosylation of immunoglobulin G Fc region on its interaction with Fc γ receptor IIIa. *Sci Rep*. 7(1):13780
- Sapinoro R, et al (2008). Fc receptor-mediated, antibody-dependent enhancement of bacteriophage lambda-mediated gene transfer in mammalian cells. *Virology*. 373(2):274-86
- Shen X, et al. (2009). Engineering and characterization of a baculovirus-expressed mouse/human chimeric antibody against transferrin receptor. *Protein Eng Des Sel*. 22(12):723-31
- Simmons CP, et al, (2007). Maternal antibody and viral factors in the pathogenesis of dengue virus in infants. *J Infect Dis*. 196(3):416-24.

- Sirohi D, et al. (2016). The 3.8Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science*. 352(6284):467-470.
- Stettler et al. (2016). Specificity, cross-reactivity and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science*. 353(6301):823-826
- Stiasny K, et al. (2011). Molecular mechanisms of flavivirus membrane fusion. *Amino Acids*. 41(5):1159-63
- Sumi S, et al. (2009). Dot-immunobinding assay. En Kurien B, Scotfield R. *Protein Blotting and Detection. Methods in Molecular Biology*, vol536. Humana Press
- Slon Campos JL, et al. (2018). The immune response against flaviviruses. *Nat Immunol*. 19(11):1189-1198
- Tada M, et al (2015). Characterization of anti-CD20 monoclonal antibody produced by transgenic silkworms (*Bombyx mori*). *MAbs*. 7(6):1138-50.
- Taylor A, et al (2015). Fc receptors in antibody-dependent enhancement of viral infections. *Immunol Rev*. 268(1):340-64
- Thulin NK, et al. (2020). Maternal Anti-Dengue IgG Fucosylation Predicts Susceptibility to Dengue Disease in Infants. *Cell Rep*. 31(6):107642
- Tirado SM & Yoon KJ. (2003) Antibody-dependent enhancement of virus infection and disease. *Viral Immunol*. 16(1):69-86
- Tsai JJ, et al. (2017). Transient Monocytosis Subjugates Low Platelet Count in Adult Dengue Patients. *Biomed Hub*. 2(1):1-16
- Wahala WM & de Silva AM. (2011) The human antibody response to dengue virus infection. *Viruses*. 2(12):2378-2395.
- Wang A, et al. (2017). Zika virus genome biology and molecular pathogenesis. *Emerg Microbes Infect*. 6(3):e13
- Wang Q, et al (2018). Antibody glycoengineering strategies in mammalian cells. *Biotechnol Bioeng*. 115(6):1378-1393.
- Wang S, et al. (2018). Characterization of product-related low molecular weight impurities in therapeutic monoclonal antibodies using hydrophilic interaction chromatography coupled with mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 154:468-475
- Wang TT, et al. (2017). IgG antibodies to dengue enhanced for FcγRIIIA binding determine disease severity. *Science*. 355(6323):395-398
- Wang Y, et al (2005). Using a baculovirus display library to identify MHC class I mimotopes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(7):2476-81
- Viswanathan K & Betenbaugh MJ (2005). Glycosylation in native and engineered insect cells. In *Handbook of Carbohydrate Engineering*.
- Vorou R (2016). Zika virus, vectors, reservoirs, amplifying hosts, and their potential to spread worldwide what we know and what we should investigate urgently. *Int J Infect Dis*. 48:85-90.
- Zhou X, et al. (2017). Vaccination with Recombinant Baculovirus Expressing Ranavirus Major Capsid Protein Induces Protective Immunity in Chinese Giant Salamander, *Andrias davidianus*. *Viruses*. 9(8):195.
- zu Putlitz J, et al (1990). Antibody production in baculovirus-infected insect cells. *Biotechnology (N Y)*. 8(7):651-4

Anexo I. Mapas de restricción de las secuencias del anticuerpo EDE1C8

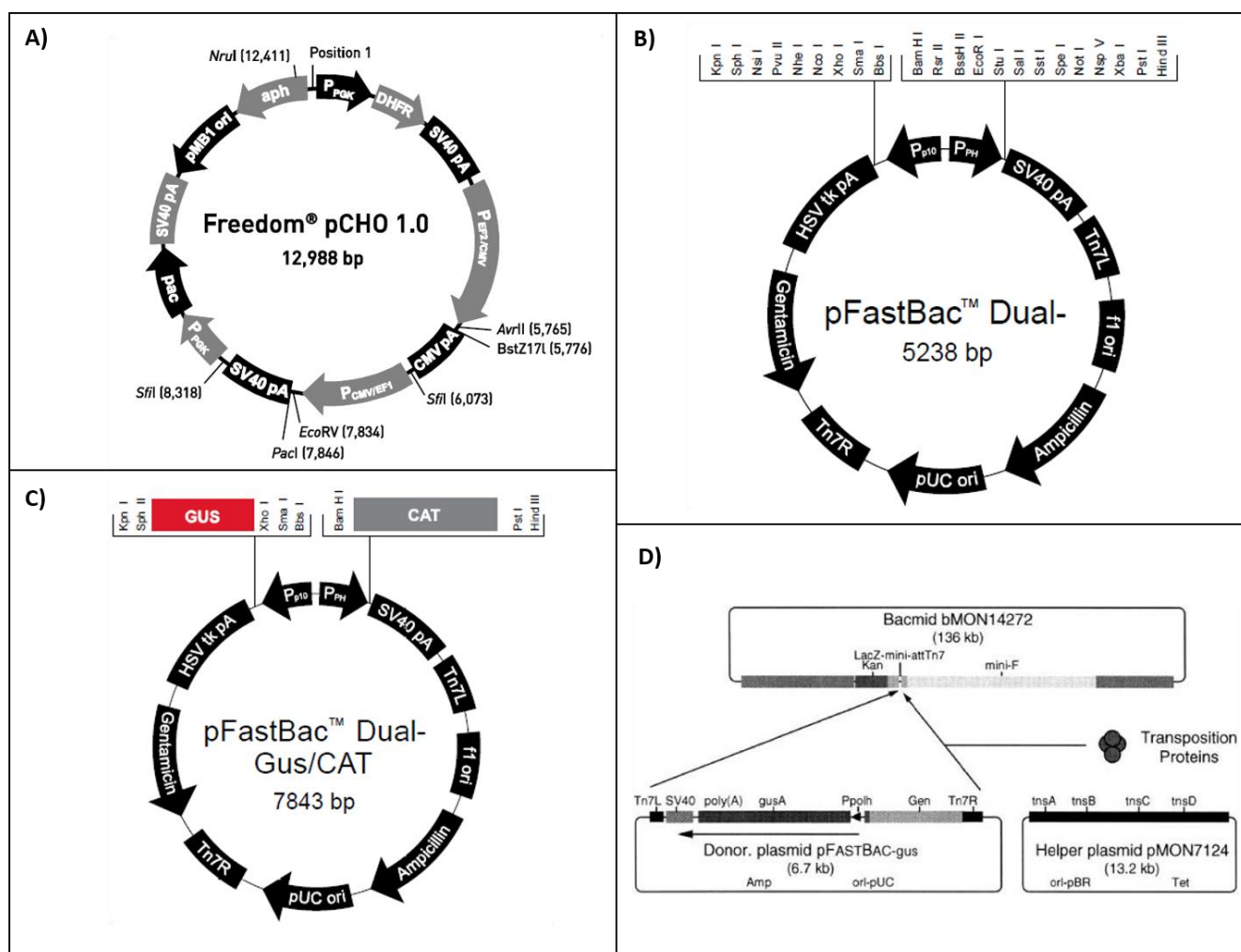


Mapas de restricción de la cadena ligera del anticuerpo EDE1C8



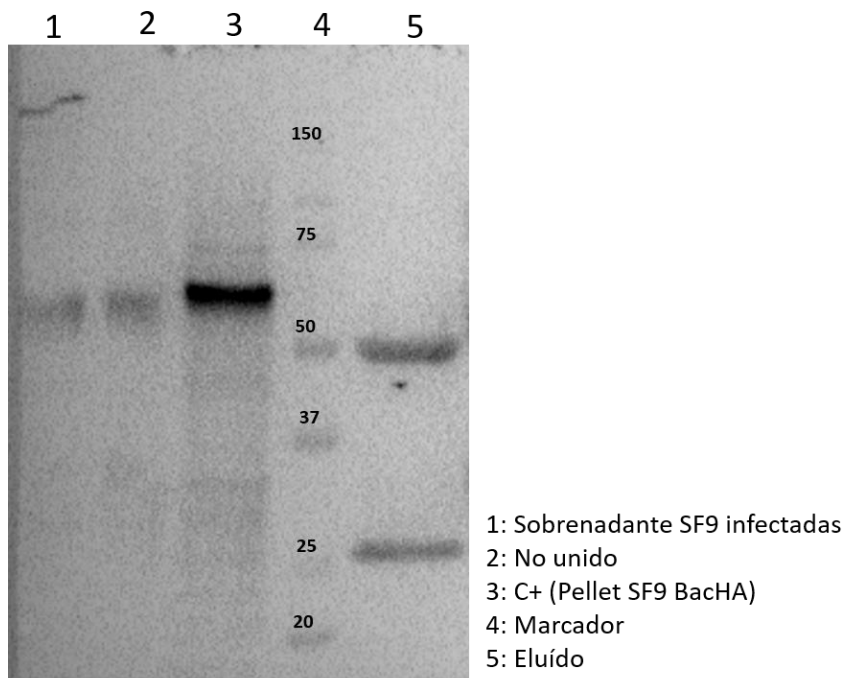
Mapa de restricción de la cadena pesada del anticuerpo EDE1C8

Anexo II. Mapas de los vectores utilizados



Mapas de los vectores utilizados. A) Freedom pCHO B) pFastBacDual C) pFastBacDual GusCat D) bácmido bMON14272.

Anexo III. Evaluación de la presencia de la glicoproteína GP64 del baculovirus en el anticuerpo purificado de células de insecto mediante Western blot



Evaluación mediante Western blot de la presencia de la glicoproteína GP64 del baculovirus en el anticuerpo purificado del cultivo de células de insecto como posible contaminante en la determinación del patrón de N-glicosilación del anticuerpo EDE1C8. En la imagen se puede apreciar en el último carril la detección de las cadenas del anticuerpo EDE1C8 como consecuencia de un reconocimiento inespecífico del anticuerpo secundario, no obstante, la banda a la altura del control positivo observada en el sobrenadante y en la fracción no unida es inexistente, indicando la ausencia de contaminación por la glicoproteína del baculovirus.