



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**Lambda como modelo de producción de vacunas (ZIKV) por la  
técnica de *phage display***

Tesis que presenta:

**IBT Honorio Negrete Méndez**

Para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias**

En la Especialidad de

**Genética y Biología Molecular**

Director de la tesis:

**Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe**

El presente trabajo se realizo en el Laboratorio 5 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la dirección del Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe.

Agradezco el apoyo brindado por el Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca (CVU No. 773632) que me brindo durante este periodo.

*Que gane el quiero la guerra del puedo*

*Joaquín Sabina*

## Agradecimientos

*Al Dr. Luis Kameyama, por su confianza al permitirme ser parte de su equipo, por compartir sus experiencias, conocimientos y visión de la ciencia. Ha sido un gran apoyo para seguir adelante.*

*A mis asesores la Dra. Rosa María Bermúdez y los Dres. Fernando Fernández, José Tapia y Gabriel Guarneros, por el tiempo invertido en escucharme y por las observaciones y apoyo recibido de su parte.*

*De manera especial a la Dra. Eva Martínez, por todo su tiempo, enseñanzas y constante apoyo. Porque tanto el ambiente como la calidad del trabajo del laboratorio recaen directamente en sus hombros y eso se merece un reconocimiento muy grande.*

*A Eli Amaro y Evelyn Bañuelos, por ser unas grandiosas personas y amigas, porque en clases fuimos un equipo magnífico y porque aun cuando los laboratorios nos separaron se que puedo contar con ustedes.*

*A Carlos "Charlie" Martínez, por ser el alma joven del laboratorio haciendo más ameno hasta los resultados más desastrosos, por siempre interesarse y preocuparse por los experimentos de los demás. Te vamos a extrañar muchísimo.*

*A mis amigas y compañeras de laboratorio Lupita y Eli, porque toda su falsa maldad tiene unos corazones muy grandes. Gracias por todo su apoyo, risas, momentos y hasta regaños. Sin ustedes yo sería un pequeño inocente incapaz de enfrentar al mundo.*

*A Guadalupe Aguilar y Dulce María del Carmen Delgadillo de la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica, por siempre apoyarnos con el mejor de los ánimos con las secuenciaciones.*

*Al Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales (LaNSE) y en especial a María de Lourdes Rojas Morales por todo su apoyo y consejos dados para realizar la microscopía electrónica.*

*A Rosa María García por todos sus consejos y preocupaciones. Además, por su apoyo en la preparación del material de trabajo usado en este proyecto.*

*A la secretaria Gabriela Mora, por siempre orientarnos y apoyarnos con todo lo que podía, como estudiantes nos quita un peso gigante de encima.*

## Dedicatorias

*A mis padres, por sentar las bases de la persona que soy. No existen palabras que describan lo mucho que agradezco su apoyo incondicional, sus sacrificios y su ayuda para que pudiera alcanzar cada una de mis metas. Para ser los mas malos, son los mejores padres que pude tener. Son mi ejemplo a seguir y los amo muchísimo.*

*A mi hermano, por ser esa chispa de la familia que nos lleva a cuestionarnos, cambiar y conocer otros horizontes. Siempre has estado ahí para escucharme y apoyarme. Espero que en esta etapa de la vida que empiezas no te decepciones de la sociedad y que siempre tengas esa esperanza en la mejora del mundo.*

*A Ale, por apoyarme en cada uno de los pasos que he dado, por escucharme y aceptarme por la persona que soy. Eres la estrella que ilumina mi vida.*

*A mis mejores amigos Lydia, Pau, Jorge y Nicky: aun cuando a veces la distancia y el tiempo nos separan por momentos, siempre han sido aquellos que dan alegría, esperanza y motivación a mi vida. Los quiero muchísimo.*

## Resumen

Las vacunas son consideradas como uno de los avances más significativos en salud pública, ya que han logrado disminuir el índice de mortalidad y morbilidad de diversas enfermedades infecciosas. La producción de vacunas puede ser tardada y costosa, por lo que los avances en ingeniería genética han generado nuevos diseños en base a una selección de antígenos que agilizan el diseño y disminuyen los costos de producción; estas pueden ser administrados en forma de péptidos, vectores, VLPs, etc. y no como microorganismos atenuados o inactivos.

Uno de estos nuevos diseños se basa en el uso de bacteriófagos o fagos, en donde, tecnologías como el “*phage display*” (despliegue de péptidos ajenos en la cápside del fago) han mostrado tener un gran potencial para el desarrollo de vacunas con las características antes mencionadas.

En este trabajo se describe la construcción de un sistema de “*phage display*” como vacuna contra el virus del zika (ZIKV). Se usó como epítotope el dominio III de la proteína de envoltura (E-DIII) de ZIKV, que fue fusionado a la proteína gpD de la cápside del fago  $\lambda$ . La proteína de fusión D-EDIII se pudo sobre-expresar y purificar en un sistema bacteriano y co-expresar en baja concentración en la cápside del fago  $\lambda$  (datos preliminares observados por Western-blot). Sin embargo, las micrografías electrónicas han mostrado que la proteína de fusión genera desestabilización de la cápside de  $\lambda$ , por lo que el fago no es capaz de ensamblarse de manera adecuada o de soportar la presión de encapsidamiento del DNA.

De momento, se trabaja en el ensamblaje óptimo del fago  $\lambda$  y de la proteína de fusión, que permita el despliegue de epitopes suficientes para activar una respuesta inmune adecuada.

**Palabras clave:** *Phage display*, ZIKV, vacuna

## **Abstract**

Vaccines are considered one of the most significant advance in public health because they achieve the reduction of mortality and morbidity index of a large number of infectious diseases. Vaccine production can be expensive and time consuming, so advances in genetic engineering have open the door for novel approaches based on the selection of specific antigens that accelerate the design and reduce the costs. These approaches can be administrated in the form of peptides, vectors or virus like particles (VLPs) avoiding the use of attenuated or inactive pathogens.

One of these designs is based on bacteriophages or “phages”, known as Phage display (a technology that allows to display peptides in phages capsid), this has shown a high potential for the development of fast and cost-effective vaccines.

This work describes the construction of a phage display system as a vaccine against zika virus (ZIKV). We use the domain III of the envelope protein (EDIII) as epitope of zika fused to the gpD capsid protein of  $\lambda$  phage. This fused protein (D-EDIII) was able to be overexpressed and purified in a bacterial system and co-ensembled in a low concentration on the phage capsid (Western-blot data). However, electronic micrographs indicate that this protein generates destabilization of the viral capsid, so the phage was unable to assembly properly or modify the pressure of genome packaging.

At this moment, we are working in optimise the assembly of  $\lambda$  phage and the fusion protein, that will allow the display of enough fusion protein to awake an adequate immune response.

**Key words: Phage display, ZIKV, vaccine**

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen</b> .....	<b>VI</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>VII</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>X</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>X</b>
<b>Índice de anexos</b> .....	<b>XI</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>12</b>
1.1 Vacunas .....	12
1.2 Bacteriófagos.....	15
1.3 Fago Lambda ( $\lambda$ ) .....	16
1.4 Phage display .....	17
1.5 Aplicaciones de phage display .....	20
1.6 Fagos como vehículos de entrega de vacunas .....	21
<b>2. Antecedentes</b> .....	<b>23</b>
<b>3. Justificación</b> .....	<b>26</b>
<b>4. Hipótesis</b> .....	<b>29</b>
<b>5. Objetivos del trabajo</b> .....	<b>30</b>
5.1 Objetivo general.....	30
5.2 Objetivos específicos.....	30
<b>6. Materiales y Métodos</b> .....	<b>31</b>
6.1 Material biológico.....	31
6.2 Propagación del material biológico .....	32
6.3 Amplificación de fragmentos .....	33
6.4 Clonación de fragmentos en pJET1.2 .....	35
6.5 Extracción de plásmidos .....	36
6.6 Análisis y selección de candidatas.....	37
6.7 Secuenciación de fragmentos.....	37
6.8 Fusión de genes mediante PCR de 2 pasos .....	38
6.9 Mutagénesis sitio-dirigida .....	39
6.10 Geles de proteínas .....	40
6.11 Western-blot .....	40

---

6.12	Curvas de crecimiento .....	41
6.13	Purificación de fagos por CsCl.....	41
6.14	Microscopia electrónica .....	42
<b>7.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>43</b>
7.1	Clonación de gpD( $\lambda$ ) en vector transitorio .....	43
7.2	Clonación de E y E-DIII (ZIKV) en vector transitorio .....	45
7.3	Construcción de fusión de genes gpD-EDIII .....	48
7.4	Inducción de la proteína D-EDIII .....	54
7.5	Ensamblaje del fago $\lambda^{D-EDIII}$ .....	57
<b>8.</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>60</b>
<b>9.</b>	<b>Conclusión.....</b>	<b>66</b>
<b>10.</b>	<b>Perspectivas .....</b>	<b>66</b>
<b>11.</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>67</b>
<b>12.</b>	<b>Anexos .....</b>	<b>72</b>

## Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
Figura 1: Diseño de fusión de genes por PCR de 2 pasos. ....	39
Figura 2: Amplificación del gen gpD( $\lambda$ ). ....	43
Figura 3: Comprobación de candidatas pJET-gpD. ....	44
Figura 4: Secuenciación de candidatas de pJET-gpD. ....	44
Figura 5: Propagación de ZIKV en células Vero. ....	45
Figura 6: Amplificación del gen E(ZIKV). ....	46
Figura 7: Comprobación de candidatas pJET-E. ....	47
Figura 8: Comprobación de candidatas pJET-DIII. ....	47
Figura 9: Secuenciación de candidatas de pJET-EDIII. ....	48
Figura 10: Fusión de genes mediante PCR de 2 pasos. ....	49
Figura 11: Comprobación de candidatas pJET-D-EDIII. ....	50
Figura 12: Secuenciación de la candidata C3 de pJET-D-EDIII. ....	51
Figura 13: Comprobación de candidatas pD-EDIII. ....	52
Figura 14: Secuenciación de candidata de pD-EDIII. ....	52
Figura 15: Análisis estructural de EDIII en construcción D-EDIII. ....	53
Figura 16: Mutagénesis sitio-dirigida en D-EDIII. ....	54
Figura 17: Expresión de la proteína D-EDIII. ....	55
Figura 18: Inmunodetección de la proteína D-EDIII. ....	56
Figura 19: Curva de crecimiento BL21/pD-EDIII. ....	56
Figura 20: Proteínas en $\lambda^{D-EDIII}$ purificado mediante PEG-8000. ....	57
Figura 21: Microscopía electrónica de en $\lambda^{D-EDIII}$ . ....	58
Figura 22: Proteínas en $\lambda^{D-EDIII}$ purificado mediante CsCl. ....	59

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
Tabla 1: Cepas y virus utilizados en este trabajo. ....	31
Tabla 2: Oligos utilizados en este trabajo. ....	35

## Índice de anexos

Anexo 1: Análisis de frecuencia de uso de codones en <i>E. coli</i> para el fragmento EDIII..	72
Anexo 2: Electroferograma de la secuenciación de la candidata A1 de pJET-gpD. ....	73
Anexo 3: Electroferograma de la secuenciación de la candidata A5 de pJET-gpD. ....	74
Anexo 4: Electroferograma de la secuenciación de la candidata A2 de pJET-EDIII.....	75
Anexo 5: Electroferograma de la secuenciación de la candidata A5 de pJET-EDIII.....	76
Anexo 6: Electroferograma de la secuenciación de la candidata C3 de pJET-D-EDIII (gpD).....	77
Anexo 7: Electroferograma de la secuenciación de la candidata C3 de pJET-D-EDIII (EDIII).....	78
Anexo 8: Electroferograma de la secuenciación de la candidata C3 de pD-EDIII (gpD).	79
Anexo 9: Electroferograma de la secuenciación de la candidata C3 de pD-EDIII (EDIII).	80
Anexo 10: Electroferograma de la secuenciación de la candidata A1 de pD-EDIII (Mod2). .....	81
Anexo 11: Electroferograma de la secuenciación de la candidata A4 de pD-EDIII (Mod2). .....	82

# Introducción

## 1.1 Vacunas

Las vacunas, utilizadas por primera vez a finales del siglo 18 por Edward Jenner, han sido el avance más significativo en salud pública. Esto debido a que han logrado disminuir la morbilidad y mortalidad de un gran número de enfermedades, incluyendo aquellas que poseyeron un gran índice de mortalidad a nivel global como la viruela y la poliomielitis (Karch 2016; Oyarzun, 2015; Roldão, 2010). La organización mundial de la salud (OMS) estima que las vacunas previenen 2-3 millones de muertes a nivel mundial y este número podría elevarse a 6 millones si todos los niños recibieran el esquema completo de vacunación (Karch, 2016). Una vacuna funciona al presentar fragmentos de un patógeno (antígenos) al sistema inmune con el fin de generar una reacción inmune. Estos antígenos preparan al sistema inmune para que cuando el organismo se encuentre expuesto al patógeno real, el sistema inmune sea capaz de atacarlo y neutralizarlo de manera eficiente (Naim, 2013).

Las vacunas tradicionales usan en su mayoría patógenos atenuados o muertos. Estas vacunas han progresado mucho desde su primer uso y muchas de ellas son utilizadas de manera global en aplicaciones clínicas. Sin embargo, aun cuando son altamente eficientes, sus preparaciones son costosas y tardadas lo que evita que exista una respuesta rápida ante un brote infeccioso (Yusibov, 2011). Además, muchos patógenos son difíciles de cultivar *in vitro* por lo que la producción de algunos tipos de vacunas es imposible (Jafari, 2016).

Los avances en ingeniería genética han proporcionado la capacidad de generar nuevos diseños de vacunas basadas en una selección de antígenos derivados de

organismos infecciosos, en lugar de utilizar el patógeno completo. Estos antígenos deben ser administrados en forma de proteína/péptido purificado, plásmidos de DNA, vectores vivos o partículas tipo virus (VLPs). A continuación, se presenta una breve descripción de cada una de estas tecnologías.

Se conoce como vacunas de subunidades a aquellas en la que el péptido/proteína es producido e inoculado de manera soluble. Estas vacunas son producidas en sistemas heterólogos modificados genéticamente y tiene como ventaja una mayor seguridad, una especificidad mejorada y una competencia antigénica reducida. Entre los sistemas disponibles para la producción comercial de subunidades recombinantes se encuentran bacterias, levaduras, células de mamífero e insecto. Cada uno de estos sistemas tiene beneficios específicos. Sin embargo, de manera general su escalabilidad es insuficiente y su costo de producción es alto (Yusibov, 2011). Entre los inconvenientes de esta tecnología es que, los antígenos puros (recombinantes o sintéticos) son generalmente menos inmunogénicos que las vacunas tradicionales por lo que es necesario la adición de un adyuvante para aumentar su efecto al momento de estimular el sistema inmune (Mohan, 2013). Otro método de aumentar la inmunogenicidad de estas vacunas es mediante la conjugación con un acarreador antigénico, sin embargo, esta conjugación es costosa y difícil de controlar (Vartak, 2016).

Las vacunas de DNA se tratan de plásmidos circulares o lineales, los cuales codifican para el gen, o un segmento del antígeno. Después de que la vacuna es inyectada, el plásmido es tomado por las células presentadoras en el sitio de inoculación y los genes son expresados en proteínas. Para que esto se lleve a cabo, es necesario que la construcción se encuentre bajo el control de un promotor eucarionte. El fin de esta vacunación es que, en el interior de las células, el antígeno sea degradado en pequeños fragmentos los cuales son presentados ante el sistema inmune por moléculas MHC clase I y II lo que permite la activación de las respuestas humoral y celular. Este tipo de vacunas presenta las ventajas de ser seguras, estables, fáciles de modificar y producir, así como no generar interferencia contra inmunizaciones posteriores. Sin embargo, es necesario una optimización del

método ya que poseen una pobre inmunogenicidad. Además, es necesario el uso de métodos de entrega a la célula (vectores virales/bacterianos, polímeros lipídicos, micropartículas de oro o VLPs) y métodos de administración al paciente (dispositivos sin agujas o parches) (Naim, 2013; Jafari, 2016).

Los vectores vivos se construyen al insertar los genes que codifican para un antígeno en el genoma de un virus o bacteria infecciosa que no sea capaz de generar una enfermedad (como por ejemplo el vaccinia virus o el bacillus de Calmette-Guérin). En el caso de los vectores virales, la estructura modular de su genoma permite tanto insertar como remplazar genes en ellos. El gen que codifica para el antígeno puede ser insertado y desplegado en la cápside del virus para su presentación al sistema inmune de la misma forma que las proteínas del virus original lo harían. Los virus obtenidos mediante estos métodos son seguros y no infecciosos. Entre los puntos importantes a considerar en este tipo de tecnología son: la estabilidad del inserto y la capacidad de producción de la proteína; el uso de un vector adecuado y seguro, así como la necesidad de un buen proceso de manufactura (Naim, 2013).

Finalmente, las VLPs son estructuras multiproteicas que mimetizan la organización y conformación del virus nativo auténtico, pero sin contener el genoma viral. Comparadas con otros métodos de vacunación, las VLPs presentan epítopes conformacionales más similares a los presentes en un virus nativo. Debido a su estructura de proteínas altamente repetitivas, estas partículas son capaces de producir una fuerte respuesta inmune en ausencia de adyuvantes. Con la ayuda de la biología molecular, es posible adaptar uno o más antígenos con un número de copias alto por lo que pueden generar una protección amplia y eficiente ya que son necesarias dosis bajas para despertar una buena reacción inmune. Se ha visto que este tipo de vacunas es capaz de despertar la inmunidad humoral, así como la celular. Pese a las múltiples ventajas que presenta esta aproximación para su uso como vacunas, su proceso de producción es costoso y difícil de escalar (Roldao, 2010).

## 1.2 Bacteriófagos

Los bacteriófagos, comúnmente conocidos como fagos, son virus que infectan bacterias, y son las entidades biológicas más abundantes del planeta. Al poseer la característica ubicua de organismos procariontes, se pueden encontrar en cualquier sitio que soporte el desarrollo bacteriano (Haq, 2012; Elbreki, 2014).

Los bacteriófagos fueron descubiertos en 1915 por Willian Twort, pero fue en 1917 que Felix d'Herelle observó su capacidad para matar bacterias, con lo que surgieron los primeros ensayos de terapia fágica a fin de utilizarlos como agentes antibacterianos. No obstante, debido a los resultados variables e impredecibles que generaba este tipo de terapia, ya que eran aplicados indistintamente a cualquier infección; así como la entrada y globalización de los antibióticos, se desplazó a los fagos como agentes terapéuticos. Posteriormente, el estudio de los bacteriófagos se centró exclusivamente en un pequeño número de fagos modelo que infectaban principalmente a la *Escherichia coli*. Estos estudios llevaron al asentamiento de la biología molecular, se logró identificar las bases del material genético, la existencia del código de nucleótidos codificantes para los aminoácidos y la identificación de las enzimas de restricción (Clokie, 2011).

Los fagos, al igual que los virus de células eucariotas, poseen una gran variedad de morfologías, así como diversas arquitecturas genéticas. Están formados de un genoma (tanto DNA como RNA de cadena sencilla o doble) con una cubierta proteica (cápside). Asimismo, y de manera general, se encuentran limitados a un rango de hospederos, normalmente infectando a una sola especie o subespecie bacteriana, debido a su necesidad de unirse a receptores específicos en la célula (Nicastro, 2014).

En cuanto a sus ciclos de replicación, se pueden dividir en 2 grandes grupos: líticos y lisogénicos. Los fagos virulentos o líticos (T4 y T7), son aquellos que redirigen el metabolismo de su hospedero y lo enfocan en la producción de nuevas partículas virales para la posterior liberación de estas mediante la lisis de la bacteria. Por otro lado, los fagos temperados o lisogénicos ( $\lambda$ ) pueden “elegir” entre el crecimiento

lítico o una relación viable a largo plazo con su hospedero en la que generalmente integra su material genético al genoma bacteriano (profago) y se replican junto con este a lo largo de muchas generaciones. La elección del ciclo replicativo depende de las condiciones que tenga con el medio externo y con la bacteria en la cual se encuentra; un fago en estado de lisogenia puede activar el ciclo lítico al censar condiciones desfavorables para la célula, como luz UV, lo que les permite generar progenie y escapar de la bacteria (Clokic, 2011; Haq, 2012; Elbreki, 2014).

En cuanto a su estructura, los fagos se pueden clasificar en icosahédricos, filamentosos y complejos. De estos 3 grupos, los fagos filamentosos (M13, Ff) se caracterizan por no generar lisis celular en ninguna circunstancia, sino que convierten a la célula en una fábrica de producción de partículas virales comprometiendo el crecimiento del hospedero (Nicastro, 2014).

### **1.3 Fago Lambda ( $\lambda$ )**

El bacteriófago lambda es un fago temperado que posee un genoma lineal de doble cadena de DNA con un tamaño de 48,502pb. La cápside del fago tiene una estructura icosahédrica de 60nm de diámetro con un grosor de 4 nm y formada por las proteínas gpE y gpD. Esta cápside se une al extremo de un tallo helicoidal flexible de 180nm constituido por la proteína gpV principalmente y en el extremo terminal, el ápice del tallo formado por la proteína J (Gamage, 2010; Nicastro, 2014). La maduración del fago empieza con la formación de la pre-cápside formada por 415 copias de gpE agrupadas en capsómeros hexaméricos o pentaméricos. Esta pre-cápside es competente para la encapsulación del genoma y, una vez terminado el empaquetamiento de este, son añadidas 405-420 copias de la proteína gpD. La proteína gpD se agrupa en trímeros los cuales sobresalen de la cápside madura y cubre la totalidad de las 20 aristas de esta, dándole estabilidad (Fogg, 2010; Gamage, 2010; Nicastro, 2014). Finalmente, el tallo flexible se ensambla, consistiendo de 32 discos y cada uno de estos se encuentra formado por 6 copias de la proteína gpV (Beghetto, 2011).

El genoma de lambda se encuentra organizado en 3 regiones que agrupan genes funcionalmente relacionados: la región izquierda (expresión tardía) posee los genes responsables del empaquetamiento y ensamblaje del genoma; la región central o región regulatoria incluye tanto los genes necesarios para el establecimiento y mantenimiento de la lisogenia, así como los genes no esenciales para el crecimiento lítico; la región derecha (expresión temprana-tardía) contiene genes esenciales en replicación de DNA y lisis de la bacteria.

El ciclo replicativo de este fago es controlado mediante un *switch* genético en el cual, la proteína represora CI juega un papel fundamental. Durante la fase lisogénica, y una vez integrado su genoma al de la bacteria, este represor asegura su propia síntesis a la vez que mantiene reprimida la expresión de los genes del fago encargados de la escisión del genoma y progresión del ciclo lítico (Fogg, 2010). Por el contrario, la inactivación del represor permite la expresión de los genes necesarios para la síntesis de nuevos viriones y la entrada al ciclo lítico. El ciclo lítico tiene una duración de 40-45 minutos y produce cerca de 100 viriones por célula infectada (Beghetto, 2011). Se ha reportado una mutante en CI la cual es sensible a la temperatura y puede ser utilizada en la activación de la lisis inducida por temperatura (Gamage, 2010). Esta variante (CI<sup>857</sup>) puede ser tener diferentes usos biotecnológicos.

## 1.4 Phage display

La tecnología de *phage display* (PD) fue introducida por George Smith en 1985. Esta técnica molecular consiste en la expresión de una proteína o péptido heterólogo, el cual es desplegado en la superficie de la cápside del virus, con diversos objetivos. La tecnología permite formar y explorar grandes bibliotecas de péptidos, los cuales pueden ser tanto aislados como caracterizados en base a su especificidad y afinidad por una molécula blanco (Beghetto, 2011; Haq, 2012). Para llevarlo a cabo, el DNA que codifica para el péptido de interés se fusiona a uno de los genes codificantes para proteínas mayoritarias de la cápside, de forma que esta

pueda expresarse en la superficie de la partícula viral (Haq, 2012; Adhya, 2014). Gracias a la unión física entre el péptido desplegado y la partícula viral, combinado con la capacidad de producción de bibliotecas de péptidos, esta tecnología se ha establecido como uno de los métodos de selección para identificación de proteínas con propiedades deseadas (Pande, 2010).

En la actualidad se han desarrollado 4 plataformas para display, utilizando fagos filamentosos, el fago lambda, así como los fagos T4 y T7.

La primera y más utilizada de estas plataformas es la basada en el fago filamentosos M13 y los fagos relacionados fd y f1 (Haq, 2012). La estructura básica de estos fagos consta de un genoma circular de ssDNA cubierto por una cápside tubular formada por una proteína principal (pVIII) y 4 proteínas adicionales en los extremos (pIII, pVI, pVII y pIX). El fago M13 ha sido ampliamente utilizado ya que su genoma se encuentra asociado únicamente a la proteína principal de cápside y no existe un límite en el llenado de esta por lo que no poseen una cantidad precisa de DNA empaquetado, permitiendo mayores oportunidades de manipulación (Nicastro, 2014). Las 2 proteínas usadas comúnmente como blancos de fusión en estos fagos son las proteínas de cápside pIII y pVIII con 5 y 2,670 copias por virión, respectivamente. De estas, la proteína pIII posee pocas restricciones de tamaño por lo que es posible la fusión con proteínas de alrededor de 100 kDa; sin embargo, la proteína pVIII debido a su gran número solo permite fusiones de 6-8 aminoácidos (Gao, 2010; Beghetto, 2011).

En el sistema de lambda, las proteínas utilizadas para fusiones son la proteína de cápside gpD y la proteína de tallo gpV con 405 y 192 copias por virión, respectivamente. De estas 2 proteínas, la más prometedora es gpD, ya que las fusiones con gpV han mostrado tener un bajo rendimiento de display por lo que existe una pobre recuperación de fagos recombinantes. Por el contrario, la proteína gpD ha mostrado la capacidad de soportar fusiones de péptidos tanto en su extremo amino como en el carboxilo con una alta densidad de despliegue (90%). El uso de péptidos grandes puede llegar a interferir la morfogénesis del fago; sin embargo, un sistema de 2 genes en el que se generan fagos mosaicos conteniendo

tanto la proteína wt como la recombinante es capaz de generar una densidad de despliegue de media a alta sin afectar el ensamblaje del fago (Beghetto, 2011).

En el caso del fago T4, se utilizan las 2 proteínas no esenciales que decoran su cápside icosaédrica. La altamente antigénica proteína externa de cápside (HOC) y la proteína menor de cápside (SOC) con 155 y 810 copias por cápside, respectivamente. Ambas proteínas pueden ser utilizadas por separado para el despliegue de péptidos de gran tamaño y además, una de las ventajas del sistema es la posibilidad de usar ambas en un despliegue dual desplegando diferentes antígenos al mismo tiempo (Gao, 2010).

Finalmente, en el fago T7 se pueden usar las 2 formas de su proteína de cápside: 10A (344-aa) y 10B (397-aa). La forma 10B es producida debido a un cambio en el marco de traducción de la proteína en el aminoácido 341 de la proteína 10A. Este sistema permite el despliegue de péptidos pequeños con un alto número de copias o péptidos grandes con un bajo/medio número de copias. Otra ventaja adicional es la alta estabilidad del fago frente a condiciones difíciles en comparación con otros fagos (Gao, 2010).

De manera general, el uso de fagos filamentosos en técnicas de *PD* representa una herramienta poderosa, pero tiene inconvenientes significativos. La primera es que la proteína desplegada en la cápside de un fago filamentosos tiene que ser capaz de traslocarse a través de la membrana celular por lo que, proteínas hidrofílicas o con cargas positivas cercanas a la señal de corte no pueden ser utilizadas como fusión; segundo, los fagos filamentosos tienen una mayor limitación en cuanto al tamaño de las proteínas a desplegar; tercero, debido a que este tipo de fagos depende de la viabilidad celular, no es posible el despliegue de proteínas/péptidos tóxicos para la bacteria; cuarto, la proteína tiene que ser capaz de mantener su estructura en el ambiente oxidante del periplasma (Beghetto, 2011; Nicastro, 2014).

Este tipo de inconvenientes presentados por el uso de fagos filamentosos puede disminuirse con el uso de fagos líticos. Debido a su naturaleza, este tipo de fagos no necesita de un sistema de secreción por membranas, en su lugar, la formación

de la cápside se da en el citoplasma y la liberación de las partículas virales se da por lisis, por lo que es posible el despliegue de proteínas hidrofílicas (Beghetto, 2011). Por otro lado, al comparar la eficiencia del *display* entre fagos filamentosos y líticos usando tanto la proteína pVIII como la proteína gpD (ambas siendo las más eficientes en su sistema correspondiente) han mostrado tener una eficiencia similar en el despliegue de péptidos pequeños. Sin embargo, en el caso de péptidos grandes la eficiencia de gpD sobrepasa la de pVIII al desplegar más proteínas por virión, de 2-3 órdenes de magnitud (Nicastro 2014).

## 1.5 Aplicaciones de phage display

La aplicación más común de *phage display*, hasta el momento, es la formación de bibliotecas de péptidos. Estas bibliotecas tienen un enorme potencial para la selección de péptidos con características deseadas. Entre las diferentes ramas en las que estos péptidos pueden usarse destacan:

El estudio de interacciones proteína-proteína mediante *PD* combinado con mutagénesis provee un método rápido para la identificación de residuos que contribuyen energéticamente a la interfase de unión entre proteínas. Se ha utilizado también el mapeo de interacciones intracelulares de diferentes dominios proteicos y los módulos de afinidad seleccionados de una biblioteca pueden ser rastreados de regreso a secuenciaciones completas de genoma para identificar parejas de unión de diferentes proteínas blanco. Esto provee una herramienta para la caracterización funcional de genes arrojados por secuenciaciones de nuevos genomas.

En enzimología se ha utilizado para la determinación de la especificidad de un sustrato y en el desarrollo de moduladores de la actividad tanto en sitio activo como en sitio alostérico. Puede ser utilizado para estudiar los mecanismos de acción enzimática y mediante técnicas de evolución dirigida buscar mejoras en la eficiencia enzimática.

En inmunología se han desplegado fragmentos de anticuerpos para su uso en proteómica, entrega específica de drogas y análisis de procesos intracelulares; esto permite el adquirir anticuerpos de manera rápida, evitando el uso de animales para inmunización. Los fagos recombinantes pueden ser guardados y usados para su posterior amplificación en caso de ser necesitados para terapia o diagnóstico. Por otro lado, se utilizan bibliotecas de epítopes con el objetivo de encontrar nuevos anticuerpos anti-tumor o anti-patógenos; estas bibliotecas también sirven para mapear epítopes de antígenos involucrados en el reconocimiento por anticuerpos lo cual es esencial en diagnóstico, inmunoterapia y desarrollo de vacunas. Finalmente, los fagos también pueden funcionar como acarreadores de antígenos en su superficie con el fin de despertar una respuesta inmune en el paciente a modo de vacuna (Pande, 2010).

## **1.6 Fagos como vehículos de entrega de vacunas**

Los fagos han sido utilizados como un vehículo potencial para la administración de vacunas en 2 sentidos: mediante la vacunación directa con fagos desplegando antígenos en la superficie de su cápside y como vehículo para entrega de vacunas de DNA.

En la vacunación directa utilizando la tecnología de *phage display*, los fagos son diseñados para el despliegue de péptidos o proteínas antigénicas en la superficie de su cápside. De una forma alternativa, se pueden probar bibliotecas de antígenos con antisueros específicos con el fin de aislar moléculas nuevas que puedan funcionar como antígenos protectores o mimótopos (péptidos que mimetizan la estructura y capacidad antigénica de un antígeno, pero con estructura primaria diferente). En algunos casos, al inmunizar modelos animales con las partículas virales completas desplegando un antígeno, se han observado respuestas de anticuerpos específicos y protección contra un reto inmune.

Además, en lugar de generar fusiones con las proteínas de cápside de un fago, existe la posibilidad de conjugar artificialmente otro tipo de moléculas de manera posterior a su crecimiento. Esto incrementa el rango de antígenos que puede llegar a ser desplegado. Debido a que las partículas fágicas se consideran como inmunoestimuladores naturales, un antígeno presentado en su cápside se encuentra conjugado con un adyuvante natural reduciendo la necesidad de una purificación y conjugación posterior con un adyuvante previo a la inmunización (Clark, 2006; Haq, 2012).

En el caso del uso como vehículos de vacunas de DNA, los fagos no modificados son capaces de entregar vacunas de DNA más eficientemente que los plásmidos estándar utilizados actualmente. En este sistema, el gen de la vacuna bajo el control de un casete de expresión eucarionte es clonado en el genoma de lambda y la partícula completa es purificada e inyectada en el paciente. La cápside del fago protege al DNA de la degradación y, al tratarse de una partícula tipo-virus esto las dirige hacia células presentadoras de antígeno donde el casete se expresa. Al comparar su eficiencia con las vacunas estándar, este tipo de vehículos han mostrado una mejor respuesta inmune en ratones y conejos (Clark, 2006; Haq, 2012).

También se ha propuesto la creación de una vacuna híbrida en la cual, la vacuna de DNA se encuentre en el interior de una partícula fágica que despliegue una variación del mismo antígeno. Se espera que este tipo de vacuna pueda activar tanto la actividad celular como la humoral del sistema inmune. Otra posibilidad es el despliegue de proteínas que dirijan la vacuna contra un tipo de células inmunes específicas. Ejemplos de esto serían los residuos de galactosa como blanco para receptores en el hígado o péptidos que puedan dirigirse contra las células de Langerhans (Clark, 2006; Haq, 2012).

## Antecedentes

El primer reporte que se tiene del uso de una partícula de fago completa utilizada para activar una respuesta inmune fue en 1988 (de la Cruz, 1988). En este trabajo, se clonaron regiones repetidas del gen de la proteína de circumsporozoito de *Plasmodium falciparum* (causante de la malaria humana) en el gen pIII del fago filamentoso f1. Se logró el despliegue de los epítopes en la superficie de la cápside permitiendo que los repetidos de la proteína heterólogas fueran accesibles para los anticuerpos. Este reconocimiento antígeno-anticuerpo fue evidenciado por microscopía electrónica y comprobado mediante el uso de mAbs en un ensayo de mapeo de epítopes B. Pese al bajo número de copias por virión obtenidas, la inoculación de estos fagos recombinantes en conejos demostró poseer una capacidad antigénica e inmunogénica. Además, las pruebas de inmunización en ratones mostraron una posible activación de genes de respuesta inmune lo cual genera el potencial de mapeo de epítopes T y posible uso en el desarrollo de vacunas.

Posterior a esto, se generaron diversos ensayos con *PD* utilizando mimótopos como el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg). El siguiente paso fue la comprobación de la función de esta vacuna frente a un reto inmunológico. Bastien y colaboradores (1997) emplearon al fago filamentoso fd para desplegar un epítoto protector previamente reportado contra el virus sincitial respiratorio humano (RSV). En este sistema se fusionaron los residuos 173-187 de la glicoproteína G de RSV al gen pIII del fago y los fagos recombinantes fueron posteriormente inoculados en ratones. Los ratones inoculados con los fagos conteniendo a la proteína gpIII fusionada con el antígeno protector mostraron una inducción alta de anticuerpos específicos contra el RSV. Más importante, estos

ratones inmunizados previamente mostraron ser completamente resistentes a la replicación de RSV lo cual fue confirmado por la ausencia de partículas virales en los pulmones de los ratones. Esto no solo muestra la capacidad antigénica e inmunogénica de las vacunas usando *phage display*, sino que comprueba la capacidad de estas de ser utilizadas en ensayos de protección contra un patógeno. Hasta el momento se han reportado diversos estudios que utilizan la tecnología de *PD* para el diseño de vacunas contra diferentes agentes etiológicos de diversas enfermedades entre los cuales se encuentran: células cancerígenas, virus, parásitos, bacterias, hongos y drogas (Bazan 2012).

Utilizando el fago lambda como plataforma de despliegue para vacunas se han reportado por lo menos 3 trabajos:

En el primero se utilizan partículas de lambda desplegando 4 regiones inmunodominantes del circovirus porcino 2 (PCV2). Estas regiones, mapeadas previamente y seleccionadas por mostrar protección contra la enfermedad, fueron fusionadas al extremo carboxilo-terminal de la proteína gpD. Con el objetivo de evitar el problema de extrapolación de datos desde el animal modelo a la especie blanco, las pruebas inmunológicas se llevaron a cabo en cerdos. En los ensayos se mostró una respuesta inmune anti-PCV2 significativa en la dosis primaria. El suero obtenido de los cerdos inoculados con la vacuna fue capaz de reconocer tanto a la proteína gpD con los antígenos fusionados, así como a los antígenos de PCV2 obtenido de un lisado de células infectadas; el suero obtenido de los mismos cerdos previo a la inmunización fue incapaz de reconocer los antígenos. Tanto los ensayos que se realizaron para comprobar la inducción de anticuerpos neutralizantes contra PCV2 como el ensayo de hipersensibilidad retardada (DTH) mostró la activación de la inmunidad humoral y celular sin presentar reacciones adversas locales ni sistémicas lo cual convierte al sistema en una vacuna potencial, la cual no necesita de adyuvantes adicionales (Gamage, 2009; Hayes, 2010). En el 2011, se realizó una comparación de la respuesta inmune observada en conejos al usar partículas de lambda desplegando la proteína Env de HIV-1, usando complementación *in-vitro* y la respuesta observada al usar la proteína soluble

gp140 oligomérica. Tanto la producción de anticuerpos con unión a Env como la de anticuerpos neutralizantes fue mayor en los animales que recibieron la proteína soluble comparada con los que recibieron al fago con la proteína desplegada. Sin embargo, este ensayo demostró que la utilización de estos fagos fue capaz de potenciar la respuesta humoral a niveles equivalentes a los obtenidos con los oligómeros de Env combinados con altas dosis de adyuvantes (Mattiaccio, 2011). Un ensayo similar de comparación de respuesta inmune fue el realizado por Thomas (Thomas, 2011) en el cual compararon una vacuna de DNA contra una vacuna de péptidos usando al fago lambda como vehículo. En esta, se observó una mejor respuesta inmune al utilizar la vacuna con los péptidos desplegados en el fago, siendo esta capaz de activar tanto la actividad inmune humoral como celular.

## Justificación

Datos de vigilancia mundial indican que, en la actualidad, los microorganismos infecciosos están emergiendo a una tasa alarmante. Los brotes causados por este tipo de organismos tienen la capacidad de propagarse rápidamente por lo que deben ser contrarrestados antes de volverse epidémicos. Tanto la cuarentena, como la rápida vacunación de la población contra este tipo de patógenos son las únicas maneras de prevenir estas epidemias en brotes masivos (Adhya, 2014).

Los métodos para producción de vacunas tradicionales, como el uso de huevos y cultivos celulares, no se encuentran diseñados para la respuesta rápida requerida para contrarrestar patógenos emergentes o amenazas de bioseguridad. Uno de los ejemplos de esto es la respuesta retardada a la pandemia de influenza del 2009 (H1N1). El virus emergía en 2009 tanto en México como California y se diseminó rápidamente a nivel global. Para el 11 de junio la OMS anuncio brotes comunitarios en múltiples regiones del mundo indicando que la pandemia estaba iniciando. Fue hasta 3 meses después que algunos fabricantes habían completado el desarrollo de la vacuna, recibido la autorización, escalado su producción y empezado a suministrar vacunas. Pese a una velocidad sin precedentes, fue hasta noviembre del mismo año cuando la vacuna se encontró disponible (Ulmer, 2015).

El panorama que presenta la producción de vacunas en México es desalentador. La producción de vacunas en nuestro país no es autosuficiente desde 1998, ni siquiera en el caso de aquellas contempladas en el Esquema Nacional de Vacunación. Para la pandemia de Influenza del 2009, se contaba con un Sistema Nacional de Vigilancia que operaba con equipos obsoletos, así como con recursos

materiales y humanos insuficientes (el sistema solo contaba con 1 millón 300 mil antivirales y 2 laboratorios de salud pública incapaces de detectar el virus). Durante este evento, el gobierno compró 30 millones de vacunas contra el virus de la influenza a los laboratorios Sanofi Pasteur y GlaxoSmithKline (Tamez, 2016; Leal-Fernández, 2010).

Recientemente, América Latina ha sido escenario de la llegada de diferentes arbovirus emergentes, como chikungunya (CHIKV) y zika (ZIKV). En ambos casos, estos virus se expandieron rápidamente en múltiples países. En la actualidad, el virus del zika se encuentra presente en 76 países alrededor del mundo. Tan solo en México, a inicios del año 2017 se habían detectado 7,599 casos y para febrero esta cifra había aumentado a 8,069 (López-Ortiz, 2017). Aun cuando ZIKV presenta una baja tasa de mortalidad, la asociación del virus a casos de Guillian-Barre y microcefalia le da a esta infección una gran importancia en lo que se refiere a salud pública (López-Ortiz, 2017). Más allá de la salud, las complicaciones y consecuencias que pueden derivarse de un manejo epidemiológico inadecuado puede llegar a afectar la economía de países en desarrollo. Tan solo para el 2016 se estimó que el impacto a nivel global de este brote es de 7,280 millones de pesos (Lopez-Ortiz, 2017); en los países afectados de América Latina se preveía que esta cifra podía crecer hasta 18 mil millones de dólares para el periodo 2015-2017 (UNDP, 2017).

Debido a que tanto el zika como el dengue se encuentran ampliamente distribuidos en las regiones de los trópicos con menor desarrollo a nivel global, su presencia en América Latina no es una sorpresa. En esta región, la presencia de los mosquitos del género *Aedes* es endémica por lo que el dengue ha estado presente desde hace algunas décadas (Rodríguez-Morales, 2015; Brett-Major, 2016). Sin embargo, al contrario del caso del dengue, la expansión geográfica del zika se encontró con una población sin protección inmunitaria, lo cual incrementa el número potencial de personas en riesgo, así como las posibilidades de nuevos brotes epidémicos e incluso pandémicos (Troncoso, 2016).

Debido a la relevancia del zika como patógeno emergente, así como el estatus socioeconómico en el cual se encuentran las regiones más afectadas por este virus, es una prioridad el desarrollo de estrategias efectivas que nos ayuden a combatir este tipo de brotes infecciosos de manera rápida y económica. La generación de una vacuna para ZIKV es de gran importancia ya que hasta el momento no existen vacunas ni tratamientos con retrovirales aprobados (Wang, 2016). El uso de *PD* en el diseño de vacunas presenta una gran cantidad de ventajas entre las que destacan de manera importante su bajo costo de producción y la rapidez en la que pueden ser construidas (Adhya, 2014).

Entre otras ventajas también se encuentran las siguientes: al contrario de los virus de eucariontes usados como vectores, los fagos no tienen la capacidad de replicarse en células eucariotas tanto por la falta de receptores específicos como por las diferencias en la maquinaria celular entre eucariontes y procariontes (Gao, 2010). Diferentes autores han reportado que el uso de *PD* como vacuna, en modelos animales, no genera reacciones adversas en el sitio de aplicación ni a nivel sistémico (Gamage, 2009). Debido a su capacidad como inmunoestimuladores naturales, las vacunas fusionadas a la cápside de un fago no requieren ni la presencia de un adyuvante ni la fusión a un acarreador posterior a su purificación (Clark, 2011). La naturaleza particulada de los fagos permite que sean reconocidos de manera eficiente por las células presentadoras de antígenos, y presentados al sistema inmune mediante los sistemas MHC clase I y II lo que lleva a la activación de inmunidad humoral y celular (Gao, 2010). Finalmente, los fagos son altamente estables; diluciones de fagos en agua pueden llegar a mantener su título aun después de un periodo de 2 semanas, dependiendo del fago utilizado y la temperatura de almacenamiento. Esta estabilidad se mantiene aún en un rango de pH de entre 3-11 por un periodo de hasta 24 horas, por lo que la administración oral es posible (Jepson, 2004).

## Hipótesis

- Lambda modificado será capaz de desplegar el Dominio III de la proteína E (ZIKV), sin modificar el ensamblaje del mismo.

## Objetivos del trabajo

### 1.7 Objetivo general

- Generar un sistema de *phage display* utilizando un fago lambda modificado que despliegue en su proteína de cápside (gpD) epitopes de la proteína E del virus del Zika (ZIKV).

### 1.8 Objetivos específicos

- 1.- Clonación de gpD( $\lambda$ ) en vector transitorio.
- 2.- Clonación de E(ZIKV) en vector transitorio.
- 3.- Construcción de la fusión de genes gpD-EDIII en un vector de expresión.
- 4.- Producción de fagos con fusión de genes en la cápside.

# Materiales y Métodos

## 1.9 Material biológico

**Cepas bacterianas (*E. coli*):** Las cepas W3110 y LE392 fueron utilizadas tanto para propagación de fago como controles en diferentes análisis. La cepa DH5 $\alpha$  fue utilizada tanto para propagación de plásmidos como para transformación de construcciones. La cepa BL21 fue utilizada para evaluar tanto la producción de proteínas, así como la producción de fagos con la proteína desplegada en su cápside.

**Bacteriófagos:** Los fagos  $\lambda$  y  $\lambda$  *cl857 ind 1 Sam7* fueron utilizados como plataformas para despliegue de proteínas. Tanto el fago  $\lambda$  como el fago  $\lambda$ <sub>NK1316</sub> fueron utilizados además como controles en diferentes experimentos.

**Virus:** Se utilizó la cepa de virus de ZIKV (KY631493.1) aislada en Tapachula, Chiapas; la cual fue proporcionada por el Dr. Jesús Miguel Torres Flores de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB-IPN).

**Tabla 1: Cepas y virus utilizados en este trabajo.**

Nombre	Genotipo	Referencia
Cepas bacterianas		
W3110	F <sup>-</sup> <i>mcrA mcrB IN(rrnD rrnE)</i> 1 $\lambda$ <sup>-</sup>	Bachmann, 1972
LE392	F <sup>-</sup> , e14 <sup>+</sup> , <i>hsdR514(r<sup>-</sup> m<sup>-</sup>) SupE44 SupF58 lacY1</i>	Silhavy, 1984
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\phi$ 80/ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>recA1 endA1 hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>) phoA supE44 <math>\lambda</math><sup>-</sup> thi-1 gyrA96 relA1</i>	Hanaba, 1983
BL21	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3)	Wood, 1966
Bacteriofagos		

$\lambda$	Wt	CSH Collection
$\lambda_{NK1316}$	b522 cl857 Pam80 nin5 mini-Tn10 <i>kan</i> Ptac-ATS transposase <i>att</i>	Kleckner, 1991
Virus		
ZIKV	KY631494.1	Sevilla-Reyes, 2017

## 1.10 Propagación del material biológico

### Propagación de bacteriófagos

A partir de un stock de fagos  $\lambda$  y  $\lambda_{NK1316}$  se realizaron diluciones seriadas con buffer TMG (1:100/4 veces) de las cuales se gotearon 10  $\mu$ l de cada dilución en un tapiz bacteriano de W3110 en medio T $\Phi$  (3 ml de medio T $\Phi$  suave y 300  $\mu$ l de un cultivo O/N de W3110). Las cajas se dejaron incubando a 37°C O/N con el fin de obtener al día siguiente placas aisladas de los fagos correspondientes.

Para la propagación se tomaron 300  $\mu$ l de un cultivo O/N de W3110 los cuales se mezclaron con 60  $\mu$ l de una solución MgCl<sub>2</sub> (0.4 M) /CaCl<sub>2</sub> (0.1 M) y 3 placas aisladas de fago. La mezcla se realizó en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se dejó reposar 15 min para la adsorción del fago. Posterior a la adsorción, se adicionaron 30 ml de medio LB y se incubo por alrededor de 6 hrs a 37°C con agitación constante hasta observar la lisis del cultivo.

Una vez obtenido el lisado se adicionaron 3ml de cloroformo y se mantuvo en agitación por 10 min adicionales. Una vez pasado este tiempo, el volumen fue centrifugado a 6,000 rpm por 10 min y se recuperó el sobrenadante. Este último se utilizó para realizar nuevamente diluciones seriadas (1:100/4 veces) las cuales fueron utilizadas para conocer el título viral.

### Propagación de ZIKV

La propagación de ZIKV se llevó a cabo en células VERO, las cuales fueron crecidas en cajas de plástico F75 (ThermoFisher), utilizando medio M199 suplementado con bicarbonato y SFB al 6% hasta alcanzar una confluencia de

≈80%. Una vez alcanzada la confluencia deseada, el medio de cultivo fue retirado y se añadieron 500 µl de un vial de ZIKV (almacenado a -80°C). El virus se dejó adsorber durante una hora a 37°C con agitación moderada cada 10 min con el fin de mantener el cultivo en exposición ante el virus. Posteriormente a la adsorción, se adicionaron 10.5 ml de medio de cultivo y se mantuvo el cultivo M199 a 37°C entre 5 a 6 días, tiempo aproximado para llevarse a cabo la propagación del virus.

Para la cosecha de ZIKV se recuperó el sobrenadante de la caja infectada y este fue almacenado en crioviales para su almacenamiento a -80°C. Se tomó 1 ml para la extracción de RNA la cual fue llevada a cabo mediante el kit de extracción de RNA viral (Qiagen). El RNA obtenido fue alicuotado y almacenado a -80°C. Todos los procedimientos llevados a cabo en este apartado se llevaron a cabo en las instalaciones del laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Ciencias Biológicas (INCB-IPN) bajo la asesoría del Dr. Jesús Torres Flores.

## 1.11 Amplificación de fragmentos

### gpD ( $\lambda$ )

Se amplificó mediante PCR el fragmento correspondiente al gen *gpD* del fago lambda utilizando los oligos correspondientes mostrados en la Tabla 2. Los oligos se diseñaron de manera que agregaran los sitios de corte para las enzimas *EcoRI* y *PstI* en los extremos 5' y 3' correspondientes. Estos oligos poseen además una modificación del codón de paro del gen (TAA) dando lugar al codón correspondiente para serina (TCT). Se utilizó DNA comercial de  $\lambda$  (Promega) como molde para la amplificación.

El mix para la reacción consistió de 2 µl de cada uno de los oligos gpD Fw/Rv (Tabla 2), 1 µl de dNTPs (2mM), 2 µl de buffer DreamTaq 10x (ThermoScientific), 0.2 µl de polimerasa DreamTaq (ThermoScientific) y se llevó a un volumen final de 20 µl con H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. Dicha reacción se llevó a cabo en un termociclador modelo

T100 (BioRad) bajo las condiciones: 1 ciclo inicial de 5 min a 95°C; 34 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 58°C y 1 min a 68°C; y 1 ciclo final de 7 min a 68°C.

El producto obtenido fue purificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y la banda del tamaño correspondiente fue recuperada mediante el kit de extracción en gel E.Z.N.A.® (OMEGA) para su clonación.

### **E (ZIKV), E-DIII (ZIKV)**

La amplificación del gen E, se inició con la producción de cDNA a partir del genoma de RNA de ZIKV lo cual se llevó a cabo usando el kit RNA iScript™ Select cDNA Synthesis (BioRad). La reacción se realizó por duplicado utilizando tanto un oligo específico como con oligos “random”.

El mix para la reacción utilizando un oligo específico consistió en 10 µl de RNA (≈69ng), 4 µl de buffer de reacción 5x, 1 µl de oligo E(cDNA) (Tabla 2), 2 µl de “gen-specific primer (GSP) enhancer”, 1 µ de retrotranscriptasa iScript y se adicionó H<sub>2</sub>O para llevar a un volumen final de 10 µl. La reacción se llevó a 42°C por 30 min y se terminó a 85°C por 5 min. Para la reacción con oligo “random” se mezcló 10 µl de RNA, 4 µl de buffer de reacción 5x, 2 µl de oligo, 1 µ de retrotranscriptasa iScript y se ajustó con H<sub>2</sub>O a un volumen de 10 µl; la reacción se incubó a 25°C por 5 min, 42°C por 30 min y 85°C por 5 min. De ambas reacciones se tomaron 4 µl para su posterior amplificación y el volumen restante fue almacenado a -20°C.

Para la amplificación de ambos fragmentos el mix de reacción consistió en 4 µL de cDNA (E) o 1 µl de una dilución (1:10) de pJET-E a los cuales se adicionó 1 µl de cada uno de los oligos E Fw/Rv o E(DIII) Fw/E Rv dependiendo el fragmento a amplificar (Tabla 2), 1 µl de dNTPs (2mM), 2 µl de buffer DreamTaq 10x (ThermoScientific), 0.2 µl de polimerasa DreamTaq (ThermoScientific) y se llevó a un volumen final de 20 µl con H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. La reacción se llevó a cabo bajo las condiciones: Temperatura inicial de 5 min a 95°C; 34 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 60°C y 1 min a 68°C; y se terminó a una temperatura de 68°C por 7 min.

El producto obtenido fue purificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y la banda del tamaño correspondiente fue recuperada mediante el kit de extracción en gel E.Z.N.A.® (OMEGA) para su clonación posterior.

**Tabla 2: Oligos utilizados en este trabajo.**

Segmento	Oligo	Secuencia	Amplificado
MCS pJet1.2	pJET1.2Fw	5'-cgactcactatagggagagcggc-3'	-
	pJET1.2 Rv	5'-aagaacatcgatttccatggcag-3'	-
	pKQV4 Rv	5'-atcaggctgaaaaatcttctc-3'	-
gpD	gpD Fw	5'-ggaattcatgacgagcaaagaaac-3'	346 pb
	gpD Rv	5'-ctgcagtaaaacgatgctgattg-3'	
E (cDNA)	E cDNA	5'-tgctttccaatggtgctg-3'	-
E	E Fw	5'-actagtatcaggtgcataggagtcagcaataggactttgtggaag-3'	1,276 pb
	E Rv	5'-gagctcaagcttagtgatggtgatggtgatgtKattttccaatggtgctg-3'	
E (DIII)	E (DIII) Fw	5'-actagtataaacttagattgaagggcgtgcatactcctgtgtaccgcag-3'	382 pb
	E Rv	5'-gagctcaagcttagtgatggtgatggtgatgtkattttccaatggtgctg-3'	
F1	gpD Link Fw	5'-ggaattcatgacgagcaaagaaacctttaccattaccagccgag-3'	385 pb
	Link (XhoI) Rv	5'-gctctgaaaatacaggttctcgagcgcaccgctaccgcctgcagtaaaacgatgctg-3'	
F2	Link (XhoI) Fw	5'- gagaacctgtatttcagagcccaccacgcccagcctgctagagataaacttagattga ag-3'	421 pb
F+F	2Step Rv	5'-gagttcaagcttagtgatggtg-3'	785 pb
Mod2	Mod2Fw	5'- gagaagaagatcaccaccactggcacaggag-3'	-
	Mod2Rv	5'- ctcctgtgccagtggtgggtgatcttcttctc-3'	
Mod3	Mod3Fw	5'- ctgaaagcactgagaacttaagatgatgctggaac-3'	-
	Mod3Rv	5'- gttccagcatcatcttagagtctcagtgctttcag-3'	

## 1.12 Clonación de fragmentos en pJET1.2

La clonación de fragmentos purificados en pJET1.2 se llevó a cabo siguiendo las especificaciones del proveedor (Thermo Scientific): se tomaron 3.5 µl del fragmento purificado, 5 µl del Buffer de reacción 2x y 0.5 µl de “Blunting enzyme”. Esta reacción fue incubada a 70°C por 5 min e inmediatamente colocada en hielo. Posteriormente se adicionaron 0.5 µl del vector pJET1.2/blunt y 1 µl de T4 DNA ligasa para incubar a 22°C por 5min. Transcurrido este tiempo, se tomó la totalidad de la reacción y se mezcló en un tubo con 50 µl de DH5α quimiocompetentes. El

tubo se mantuvo en hielo por 30 min seguido de un choque térmico a 42°C por 30seg y fue colocado en hielo por 2 min. Para la recuperación de las células se adicionó 1 ml de medio SOC y se incubaron a 37°C por 1 hr.

Una vez recuperadas, las bacterias transformadas se centrifugaron a 21,000 x *g* por 1 min para retirar casi en su totalidad del medio dejando 10 µl de este. La pastilla obtenida fue resuspendida en este volumen, plaqueada en cajas de LB e incubada a 37°C por 18 hrs.

## 1.13 Extracción de plásmidos

### Miniprep

La extracción de plásmidos se realizó siguiendo el protocolo dado por Sambrook & Russel con ligeras modificaciones. Las células o bacterias fueron crecidas en 5 ml de medio LB a 37°C *overnight* (O/N). Al día siguiente cada cultivo se centrifugó a 21,000 x *g* por 1 min y el sobrenadante fue descartado. La pastilla celular se resuspendió en 100 µl de Solución I (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA; pH= 8.0), se añadieron 200 µl de Solución II (0.2N NaOH, 1%SDS) y se mezcló por inversión para finalmente agregar 150 µl de Solución III (5M acetato de potasio, ácido acético) y nuevamente mezclar por inversión. La mezcla se dejó reposar 5 min en hielo y posteriormente se centrifugó en frío a 21,000 x *g* por 5 min. El sobrenadante fue recuperado y colocado a un tubo nuevo al cual se le añadió 5 µl de RNAsa (2 mg/ml) dejándola incubar a temperatura ambiente por 20/30 min. Posteriormente se adicionó un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) lo cual fue mezclado y centrifugado a 21,000 x *g* por 2 min. La fase acuosa obtenida se recuperó y se le adicionó 1 ml de etanol absoluto a temperatura ambiente (R/T) y se dejó reposar por 1 min. Posteriormente se centrifugó a 21,000 x *g* por 5 min y el sobrenadante fue desechado. Este mismo paso se repitió utilizando lavando con etanol (70%) y centrifugando a 21,000 x *g*. La pastilla obtenida se dejó secar a R/T y finalmente fue resuspendida en 20 µl de agua inyectable o TE (0.1%) dependiendo del uso posterior (Sambrook & Russel, 2001).

## 1.14 Análisis y selección de candidatas

### Selección por restricción enzimática

La selección de candidatas de pJET-gpD se realizó mediante digestión enzimática con *Pst*I. Se utilizó 1 µg de DNA plasmídico, 10 U de la enzima *Pst*I (New England Biolabs), 2 µl de buffer 2.1 (New England Biolabs) y se ajustó a un volumen final de 20 µl usando H<sub>2</sub>O inyectable. La reacción se incubó por 4 hrs a 37°C y la liberación de inserto se analizó en un gel de agarosa (0.8%). Los plásmidos que liberaron un fragmento de 707 pb fueron secuenciados.

### Selección por “Colony PCR”

Se tomó una colonia la cual fue resuspendida en 100 µl de H<sub>2</sub>O y se le adicionó una pequeña porción de perlas de vidrio. Esta suspensión se agitó por vórtex durante 5 min y se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min a TA. Una vez centrifugado, se tomó 1 µl del sobrenadante el cual fue utilizado como DNA molde para una amplificación de PCR. Esta se llevó a cabo bajo las mismas condiciones utilizadas para la amplificación de los fragmentos a comprobar.

## 1.15 Secuenciación de fragmentos

La reacción de secuenciación consistió en 1 µl de DNA plasmídico (0.5 µg), 1 µl del oligo pJET1.2 Fw, pJET1.2 Rv o pKQV4 Rv dependiendo de la construcción a secuenciar (Tabla 2), 4 µl de buffer 5x, 1 µl de betaina, 1 µl de mix BigDye V.1.1 y se ajustó a un volumen final de 10 µl con H<sub>2</sub>O inyectable. La reacción se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 94°C por 10 min, 50 ciclos de 94°C por 30 seg, 55°C por 20 seg y 60°C por 2 min, y una ronda final a 60°C por 7 min. Para las secuenciaciones en vectores pJET se utilizaron los oligos provisto por el kit ClonJET (ThermoFisher, #K1231); en el caso de las secuenciaciones en pKQV4 se utilizó el oligo Rv y el oligo Fw previamente diseñados para la construcción.

El producto obtenido, se purificó transfiriéndolo a un tubo de 1.5 ml, donde se adicionaron 5 µl de EDTA (125 mM; pH=8) y 60 µl de Etanol absoluto para agitarlo brevemente e incubarlo por 30 min a temperatura ambiente (RT). Una vez pasado

este tiempo, la mezcla fue centrifugada a 21,000 x g por 20 min e inmediatamente se retiró el sobrenadante. La pastilla resultante se lavó con 250 µl de etanol al 70% y se centrifugó a 21,000 x g por 10 min; este lavado se repitió 1 vez más. Finalizado el último lavado, se retiró el sobrenadante y la pastilla se dejó secar a RT.

## 1.16 Fusión de genes mediante PCR de 2 pasos

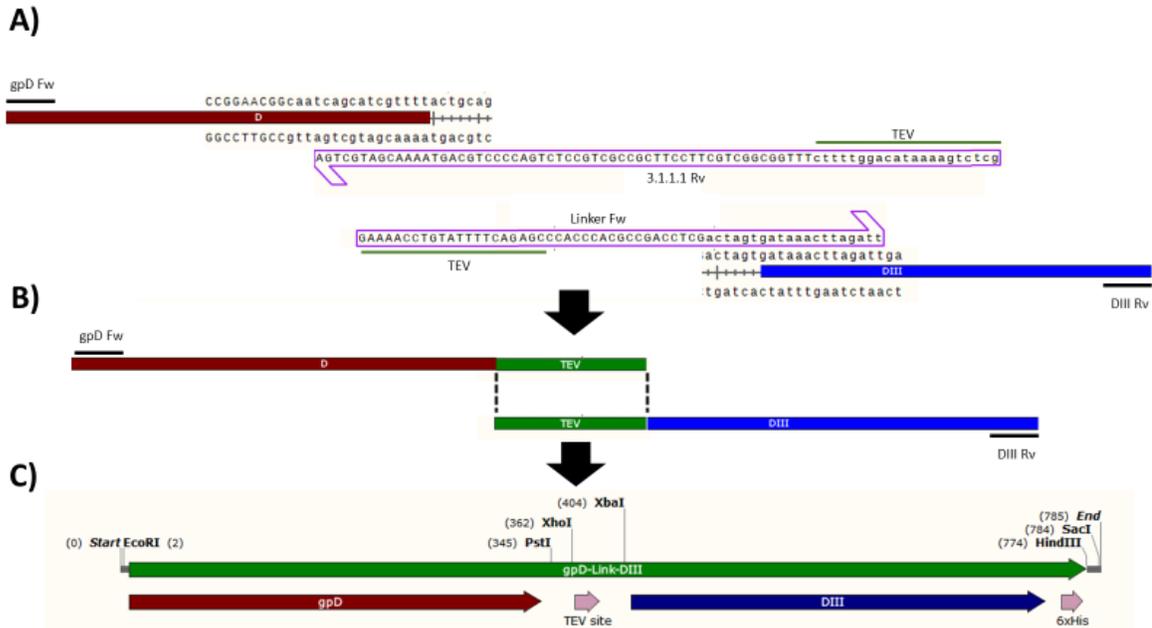
El primer paso de la fusión de genes consiste en la amplificación de los fragmentos a fusionar para lo cual se diseñaron oligos largos (Figura 1A) los cuales adicionan la región de homología en los extremos 3' y 5' de cada fragmento para que permitan la fusión en el segundo paso de amplificación.

El mix de reacción consistió en 1 µl de una dilución (1:10) del plásmido pJET-gpD (Fragmento 1) o del plásmido pJET-EDIII (Fragmento 2) como DNA molde. A este se le adicionó 2 µl de buffer de reacción DreamTaq 10x (Thermo Scientific), 1 µl de dNTPs, 1 µl de cada oligo gpD Link Fw/ Link(XhoI) Rv para el fragmento 1 y Link(XhoI) Fw/E Rv para el fragmento 2 (Tabla 2), 0.2 µl de polimerasa DreamTaq (Thermo Scientific) y se llevó a un volumen final de 20 µl con H<sub>2</sub>O. Ambas reacciones se llevaron bajo las condiciones: 1 ciclo inicial de 5 min a 95°C; 34 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 66°C y 1 min a 68°C; y 1 ciclo final de 7 min a 68°C. Los productos obtenidos se purificaron en gel y se cuantificaron.

Una vez purificados los fragmentos se llevó a cabo un paso intermedio alineado las secuencias de homología (Figura 1B). Esta se realizó por duplicado colocando en la primera 5 ng y en la segunda 10 ng de cada fragmento. A esta mezcla se adicionó 1 µl de buffer de reacción DreamTaq 10x (Thermo Scientific), 0.5 µl de dNTPs, 0.1 µl de polimerasa DreamTaq (Thermo Scientific) y llevando cada reacción a un volumen final de 10 µl.

Para el segundo paso de amplificación (Figura 1B) se tomó 1 µl de cada una de las reacciones de alineamiento y se mezclaron de manera independiente con 5 µl de buffer de reacción DreamTaq 10x (Thermo Scientific), 2.5 µl de dNTPs, 0.5 µl de polimerasa DreamTaq (Thermo Scientific), 2.5 µl de cada oligo gpD Fw/2Step Rv (Tabla 2) y se llevó a un volumen final de 50 µl. El producto obtenido se corrió en

un gel de agarosa y se purifico exclusivamente la banda correspondiente al tamaño esperado de 785 pb (Figura 1C).



**Figura 1: Diseño de fusión de genes por PCR de 2 pasos.** (A) Los genes gpD (rojo) y E-DIII (azul) con las secuencias de nucleótidos en los extremos 3' y 5' correspondientemente. Se muestran la región donde hibridan los oligos diseñados para adicionar la región del linker y TEV correspondientes al primer paso de la fusión. (B) En un primer paso, se hibridan las regiones de homología TEV (verde) para que pueda llevarse a cabo una segunda amplificación con oligos que flanquean la construcción (gpD Fw, DIII Rv). (C) Fusión gpD-EDIII de un tamaño de 785pb; se resaltan los segmentos de la fusión, así como los sitios de corte único para enzimas de restricción.

## 1.17 Mutagénesis sitio-dirigida

Para realizar la mutagénesis sitio dirigida se diseñaron un par de oligos largos, con ayuda del programa QuickChange Primer Design (Agilent), para cada uno de los cambios a realizar. La mutagénesis se realizó utilizando el kit QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis (Agilent) para lo cual, la mezcla de reacción consistió en 1 µl del vector pD-EDIII (≈100ng), 2.5 µl del buffer de reacción, ≈62.5 ng de cada uno de los oligos Mod2 Fw/Rv o Mod3 Fw/Rv dependiendo de la mutación a corregir, 0.5 µl de dNTPs, 0.75 µl de QuickSolution, 0.5 µl de la enzima QuickChange (Agilent) y se ajustó a un volumen de 25 µl utilizando H<sub>2</sub>O inyectable. La reacción se llevó a cabo bajo las condiciones: 1 ciclo inicial de 2 min a 95°C; 18 ciclos de 20 seg a 95°C, 10 seg a 60°C y 3.5 min a 68°C; y un ciclo final de 5 min

a 68°C. Una vez terminado, se adiciono a la reacción 2 µl de la enzima *DpnI* y se incubó por 5 min a 37°C. De esto, se tomaron 2 µl para ser electroporados en bacterias DH5α competentes.

## 1.18 Geles de proteínas

Los perfiles de proteínas, tanto de bacterias como de fagos, se evaluaron mediante geles de acrilamida al 13%. La porción separadora de cada gel consistió en 2.86 ml de Bis-acrilamida, 1.65 ml de buffer Tris-HCl 1.5 M (pH=8.8), 132 µl de SDS (10%), 1.98 ml H<sub>2</sub>O, 30 µl de persulfato de amonio (BioRad) y 10 µl de TEMED (BioRad). La porción concentradora consistió en 0.91 ml de Bis-acrilamida, 1.375 ml de buffer Tris-HCl 0.5M (pH=6.8), 110 µl de SDS (10%), 3.102 ml H<sub>2</sub>O, 30 µl de persulfato de amonio y 10 µl de TEMED. Los geles fueron montados en placas de cristal de 1.5 mm (BioRad) y se dejaron polimerizar para posteriormente cargar 30 µl de cada muestra y 5 µl de marcador [Precision Plus Protein Dual Xtra (BioRad)] y se corrieron a 60 V por 4 hrs.

## 1.19 Western-blot

La transferencia a la membrana se llevó a cabo haciendo un sándwich con papel filtro, membrana, gel y papel filtro; tanto el papel filtro como la membrana fueron humedecidos previamente con buffer de tanque (Tris-Glicina 20% metanol, 0.1% SDS). Se colocó el sándwich en la cámara de transferencia asegurándose de colocar la membrana en dirección del cátodo y se corrió a 60 V por 1hr.

Una vez llevada a cabo la transferencia a la membrana, esta se colocó en solución de bloqueo (PBS 7% leche Svelty y 0.2% Tween20 (BioRad)) y se mantuvo en agitación por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la solución de bloqueo fue sustituida por 10 ml de una nueva solución de bloqueo adicionada con anticuerpo primario (6xHis) (GeneTex) a una dilución 1: 3,000. La membrana fue incubada a 4°C con agitación durante toda la noche.

Una vez realizada la incubación con el anticuerpo primario, este fue retirado y se realizaron 3 lavados a la membrana de 10 minutos cada uno con una solución de PBS 0.2%Tween. El anticuerpo secundario (anti-ratón) fue agregado en una solución de PBS 0.2%Tween 2% leche Svelty y se incubó a temperatura ambiente por 2hrs. Pasado este tiempo, la membrana fue lavada de la misma manera que anteriormente y la membrana fue colocada en 10 ml de PBS.

El revelado de la membrana se realizó con el kit SuperSignal® West Femto (ThermoFisher, #34094) de acuerdo con las especificaciones del proveedor.

## 1.20 Curvas de crecimiento

Las cepas utilizadas para la realización de este ensayo fueron: BL21, BL21/pKQV4, BL21/pKQV4/pRARE, BL21/pD-EDIII y BL21/pD-EDIII/pRARE; estas cepas se evaluaron tanto con como sin inducción. Se tomaron 300µl de un cultivo O/N de cada una de las cepas y se inocularon por duplicado en tubos de vidrio con 10ml de medio LB. Los tubos que fueron inoculados con las cepas conteniendo los vectores pKQV4 y D-EDIII se les adicionó ampicilina a una concentración de 100 µg/ml y aquellas conteniendo el vector pRare se les colocó adicionalmente cloranfenicol a una concentración de 30 µg/ml. La inducción se llevó a cabo en un tubo por cada cepa adicionando IPTG a una concentración final de 0.5 mM. Todas las cepas se ajustaron a una O.D.=0.1 y se incubaron a 37°C durante 8 hrs midiendo la densidad óptica a 600 nm cada hora. Los ensayos se realizaron por triplicado y se graficó el promedio de cada medición.

## 1.21 Purificación de fagos por CsCl

Los fagos obtenidos por lisado fueron precipitados con polietilenglicol 8000 (PEG-8000) a una concentración final de 16% (m/v) y NaCl a una concentración de 1.4 M, se mantuvieron en incubación en hielo un mínimo de 8 hrs. El volumen resultante se centrifugó a 19,000 x g por 15 min y la pastilla de fagos resultante se resuspendió en 1ml de buffer TMG. El PEG-8000 se eliminó adicionando un volumen de cloroformo, agitando en vortex y centrifugando a 20,000 x g por 1 min. El sobrenadante fue recuperado y colocado en un nuevo tubo eppendorf.

Los fagos se purificaron mediante un gradiente discontinuo de CsCl en tubos Ultra-Clear (14x95mm; Beckman) utilizando las densidades 1.08, 1.3, 1.5 y 1.7 g/cm<sup>3</sup>. Estas diluciones se colocaron de mayor a menor agregando de la solución más densa 3.5 ml y de las demás 2.5 ml por solución. Los fagos purificados mediante PEG se mezclaron con 1 ml de la solución menos densa y se colocaron hasta el final. Los tubos fueron centrifugados a 22,000 rpm por 2:30hrs a 4°C utilizando un rotor SW40-Ti (Beckman). La banda obtenida fue recuperada y dializada, realizando 2 cambios de 500 ml de buffer de fosfatos por 8 hrs.

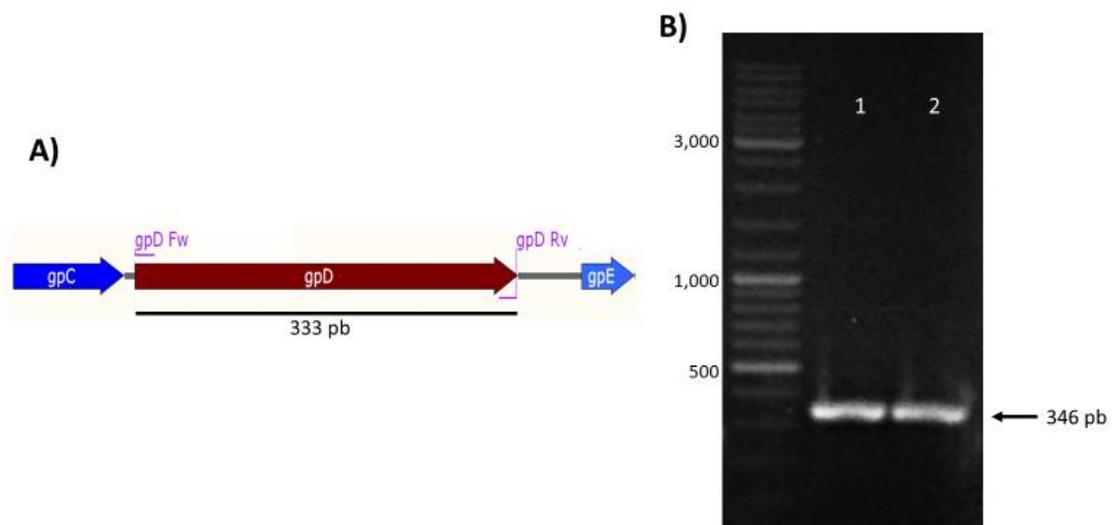
## **1.22 Microscopia electrónica**

Para la microscopía electrónica se prepararon rejillas de cobre (200 mesh) las cuales fueron cubiertas con fomvar (0.3%) y sombreadas con carbón para contrastar las muestras. Se colocaron 10 µl de la solución de fagos dializada y se dejó reposar por 2 min permitiendo que los fagos se depositaran en la rejilla y el exceso de líquido fue retirado con papel filtro. Los fagos se contrastaron utilizando una solución de acetato de uranilo (2%) del cual se colocaron 10 µl sobre la muestra y el exceso fue retirado con papel filtro. Esto se repitió 2 veces más con tiempos de 30 seg y 2 min respectivamente antes de retirar el líquido. Una vez realizado esto, se observaron a 50,000, 60,000 y 150,000 aumentos usando el microscopio electrónico JEM-2000 EX (JEOL).

# Resultados

## 1.23 Clonación de gpD( $\lambda$ ) en vector transitorio

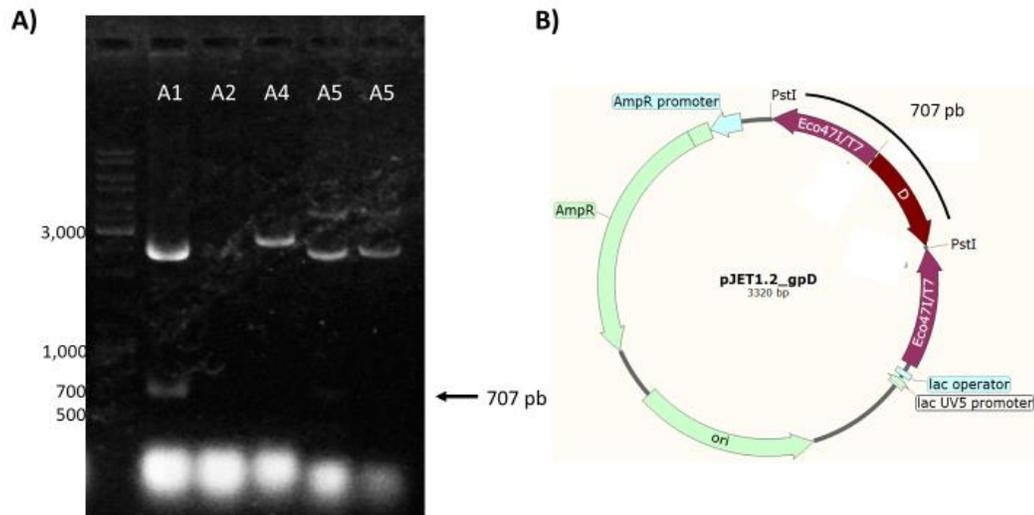
Se realizó la amplificación por PCR del gen *gpD* (tamaño aproximado de 333 pb (Figura 2A). La adición de las secuencias para los sitios de corte por enzimas en los oligos aumenta su tamaño a un fragmento de 346 pb. El producto obtenido fue observado en un gel de agarosa (0.8%) (Figura 2B).



**Figura 2: Amplificación del gen gpD( $\lambda$ ).** (A) El gen gpD del fago  $\lambda$  (333 pb) fue amplificado mediante PCR tomando usando oligos que flanquean al gen. (B) El ensayo se realizó por duplicado y se puede observar en un gel de agarosa (0.8%) la banda correspondiente al gen gpD (346 pb) en ambos carriles (1, 2)

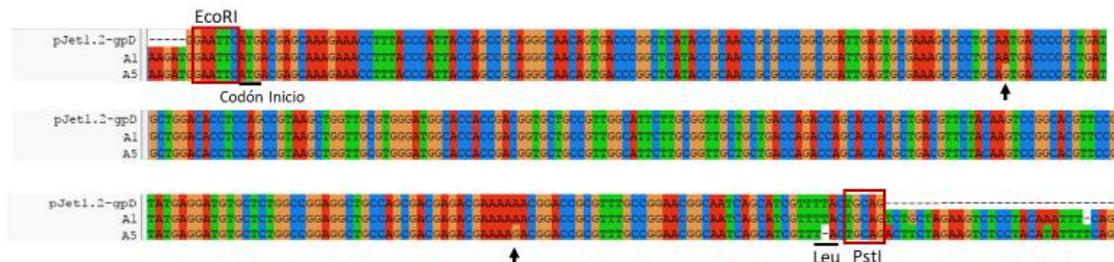
El fragmento de PCR purificado fue clonado en el vector transitorio pJET1.2. Se obtuvieron aproximadamente 100 candidatas, al ser transformado en DH5 $\alpha$ , de las cuales 5 fueron seleccionadas para extracción de plásmidos y se comprobó la presencia del inserto mediante restricción enzimática con *Pst*I. De éstas, sólo las candidatas gpD-A1 y gpD-A5 liberaron un fragmento de 707 pb (Figura 3A). De

acuerdo con el análisis *in silico*, la liberación de este fragmento indica la presencia del inserto y el ingreso de éste en el sentido correcto (Figura 3B).



**Figura 3: Comprobación de candidatas pJET-gpD.** (A) Candidatas mediante digestión con *PstI*; la candidata gpD-A1 y la gpD-A5 muestran la liberación de un fragmento de 707 pb correspondiente al segmento entre los 2 sitios *PstI* en el vector con la clonación de gpD. (B) Mapa del vector pJET-gpD remarcando los sitios reconocidos por la enzima *PstI* y el tamaño entre estos.

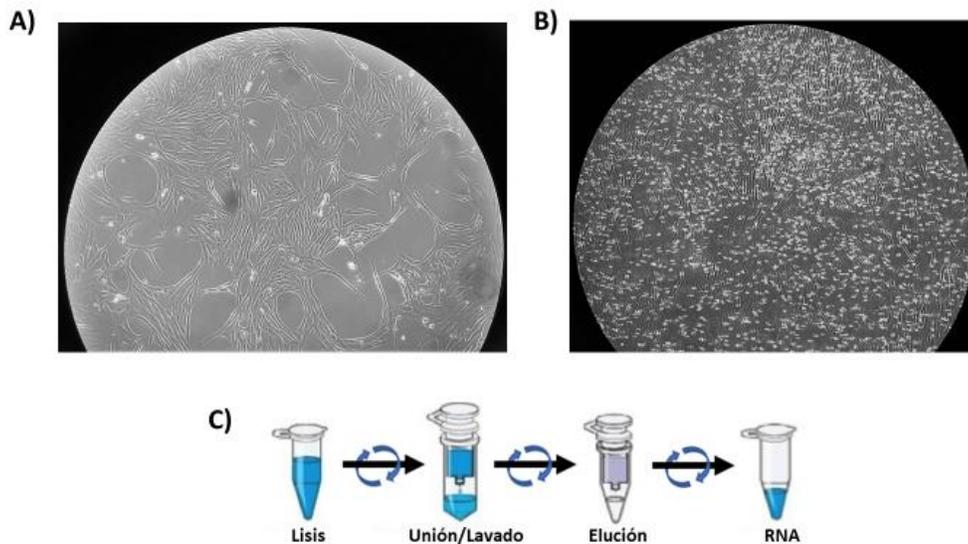
Las secuencias de los insertos de las candidatas A1 y A5 fueron comparadas con la secuencia de referencia con el programa ClustalX. En ambas secuencias se pudo leer desde el sitio de corte *EcoRI*, junto con el codón de inicio, hasta el sitio de corte con *PstI* adyacente al codón de paro modificado. Solo la candidata A1 mantenía la secuencia sin cambios por lo que fue la única considerada para ensayos posteriores (Figura 4).



**Figura 4: Secuenciación de candidatas de pJET-gpD.** Secuencia de las candidatas A1 y A5 (renglones 2 y 3) comparada con la secuencia obtenida *in-silico* del vector pJET-gpD (renglón 1). En cuadros rojos se observa los sitios de corte para enzimas de restricción; subrayados el codón de inicio y el codón de paro modificado; y con flechas las mutaciones encontradas en la secuencia.

## 1.24 Clonación de E y E-DIII (ZIKV) en vector transitorio

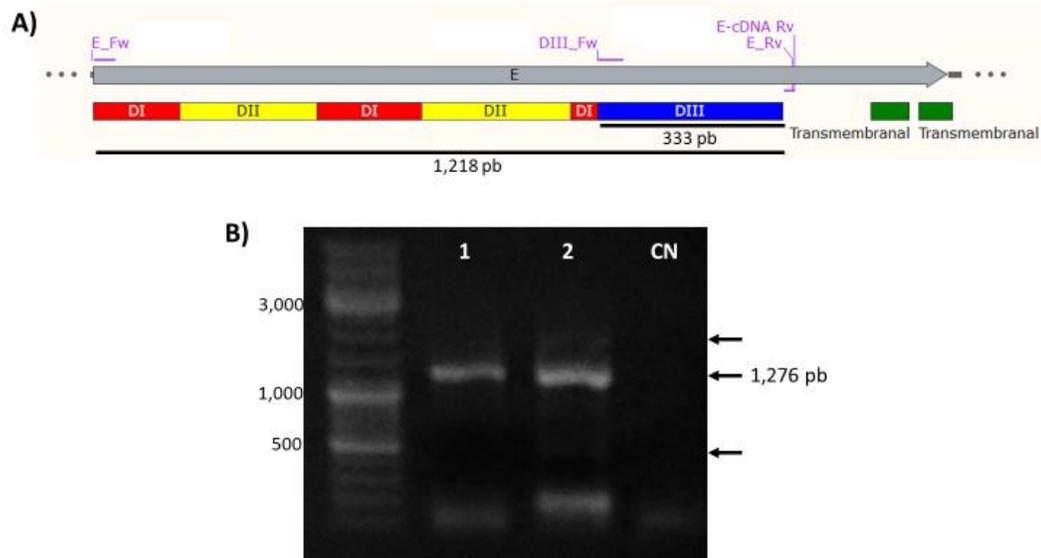
El virus de zika fue propagado en células VERO presentando un 80% de confluencia (Figura 5A). El cultivo infectado se revisó cada 2 o 3 días hasta determinar el momento adecuado para cosechar el virus, ya que la mayoría de las células despegadas indica la infección viral (Figura 5B). Una vez llegado a este punto, el virus fue obtenido del sobrenadante y su material genómico fue extraído mediante la metodología esquematizada y representada en la en el panel C de la Figura 5.



**Figura 5: Propagación de ZIKV en células Vero.** (A) Cultivo de células Vero pre-infección (80% confluencia). El cultivo 5 días post-infección (B) presenta un gran porcentaje de la monocapa desprendida lo cual es señal para terminar la infección y recuperar el virus. La purificación del material genético de ZIKV se realizó mediante el kit “Viral RNA Isolation” siguiendo un proceso esquematizado en (C)

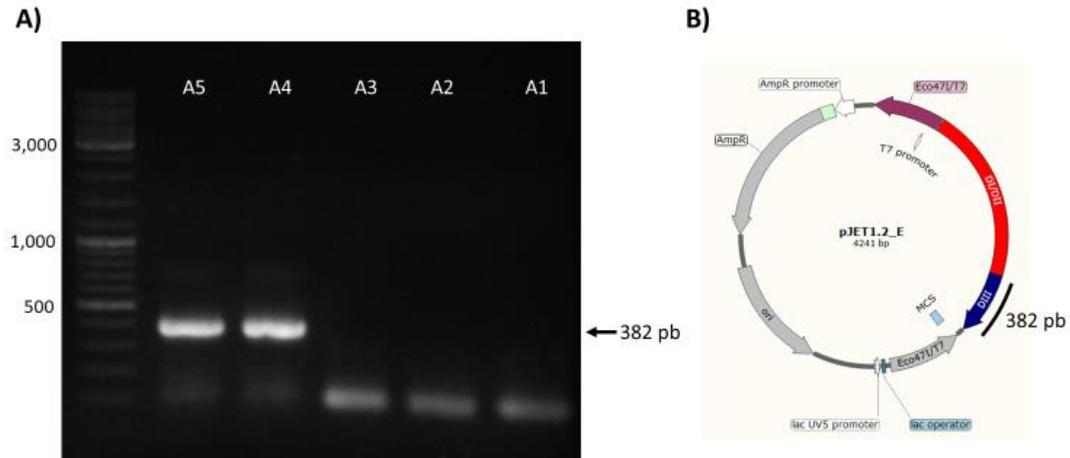
El RNA viral fue cuantificado mediante nanodrop, debido a la baja concentración de (6.9 ng/μl) y a la calidad de RNA obtenido por kit, no se realizó la comprobación de integridad por electroforesis. El RNA obtenido, sirvió de molde para la obtención de cDNA usando tanto un oligo específico como uno “random”. Ambos cDNAs fueron utilizados para amplificar por PCR la región correspondiente al ectodominio del gen E (tamaño aproximado de 1,218 pb). La adición de las secuencias correspondientes a los sitios de corte para enzimas de restricción y el tag de Histidinas aumenta el tamaño del amplificado a 1,276 pb. Los productos obtenidos se corrieron en un gel de agarosa al 0.8% observando la presencia de una banda

del tamaño esperado al utilizar ambos oligos. Sin embargo, también se pudo observar bandas inespecíficas tenues en el amplificado al utilizar los oligos “random” (Figura 6).



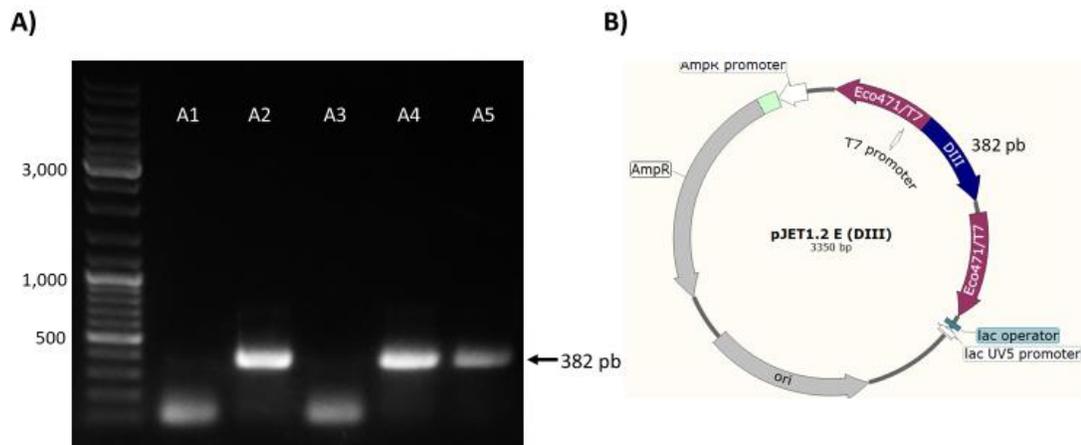
**Figura 6: Amplificación del gen E(ZIKV).** (A) Gen E de ZIKV y los diferentes dominios dentro de este; se observa la región correspondiente al ectodominio (1,218 pb) y la región correspondiente al DIII (333 pb); así como la región a la cual se unen los oligos diseñados. (B) La porción del ectodominio fue amplificada mediante PCR tomando como molde cDNA generado a partir de un oligo específico (1) y un oligo “random” (2). Se puede observar en un gel de agarosa (0.8%) la banda correspondiente al gen E fusionado a un tag de Histidinas (1,276 pb) en ambos carriles. Sin embargo, el amplificado obtenido a partir del oligo “random” (2) presenta productos inespecíficos marcados en flechas.

El fragmento del gen E del virus de Zika fue clonado en el vector transitorio pJET1.2 y transformado en DH5 $\alpha$ . De las candidatas obtenidas fueron seleccionadas 5, las cuales se analizaron mediante “Colony PCR” utilizando los oligos diseñados para amplificar la región E-DIII (382 pb). De estas candidatas, se observaron que tanto la candidata E-A4 como la E-A5 generaron un fragmento del tamaño esperado (Figura 7A) lo cual indica la presencia del gen E en el vector transitorio. En el panel B de la Figura 7 se puede apreciar el vector pJET-E y la región de 382 pb.



**Figura 7: Comprobación de candidatas pJET-E.** (A) "Colony PCR" de 5 colonias obtenidas a partir de la clonación en pJET1.2 del gen E fusionado a un tag de Histidina. Las candidatas se evaluaron utilizando los oligos diseñados para la amplificación del E-DIII (382 pb). (B) Mapa estimado del vector pJET-E; se muestra el segmento correspondiente al DIII utilizado para verificar la presencia del gen E en el vector.

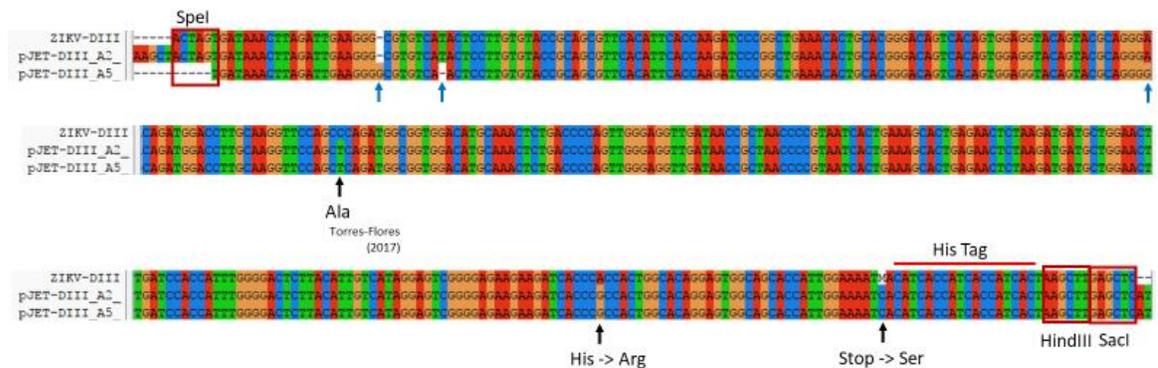
De las candidatas pJET-E se amplificó exclusivamente el fragmento correspondiente al DIII del gen E. Este amplificado se purificó y se clonó en pJET1.2 para formar el vector pJET-EDIII. De estas, se probaron 5 candidatas mediante "Colony PCR" (Figura 8A); tanto las candidatas DIII-A2, DIII-A4 y DIII-A5 generaron el fragmento correspondiente al DIII (382 pb). En el vector pJET-DIII diseñado *in-silico* se remarca la región correspondiente al DIII (Figura 8B).



**Figura 8: Comprobación de candidatas pJET-DIII.** (A) "Colony PCR" de 5 colonias obtenidas a partir de la clonación en pJET1.2 del fragmento correspondiente al DIII del gen E de ZIKV fusionado a un tag de Histidina. Las candidatas se evaluaron utilizando los oligos diseñados para la amplificación del EDIII (382 pb). (B) Mapa estimado del vector pJET-EDIII; se muestra el segmento correspondiente al DIII.

Se secuenciaron únicamente las candidatas A2 y A5 de pJET-DIII. Las secuencias obtenidas fueron alineadas y comparadas contra la secuencia de referencia

obtenida *in-silico* (Figura 9). Se puede observar la secuencia completa de ambas que va desde el sitio de corte *SpeI* hasta los sitios *HindIII* y *SacI*. En la región 3' del gen se encuentra la secuencia perteneciente al tag de Histidinas y al codón de paro modificado que da como resultado el codón para Serina (TCA). Se muestran además las mutaciones compartidas entre ambas secuencias, en las que una se encuentra reportada previamente por el grupo del Dr. Torres y una mutación "nueva" la cual genera un cambio de aminoácidos (H103R). Dado que el plásmido obtenido de la candidata A1 es el menos modificado, fue el utilizado para ensayos posteriores.

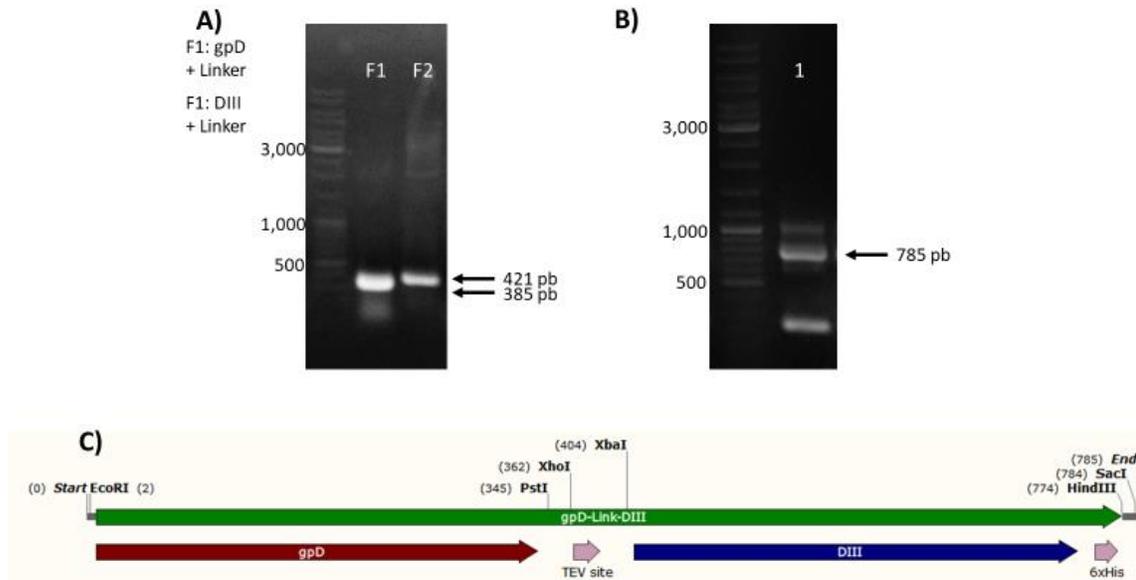


**Figura 9: Secuenciación de candidatas de pJET-EDIII.** Secuencia de las candidatas A1 y A5 (renglones 2 y 3) comparada con la secuencia obtenida *in-silico* del vector pJET-EDIII (renglón 1). En cuadros rojos se observa los sitios de corte para enzimas de restricción; marcado con una línea roja la región correspondiente al tag de Histidinas; con flechas negras las encontradas en ambas secuencias y con flechas azules las mutaciones encontradas exclusivamente en la candidata A5.

## 1.25 Construcción de fusión de genes gpD-EDIII

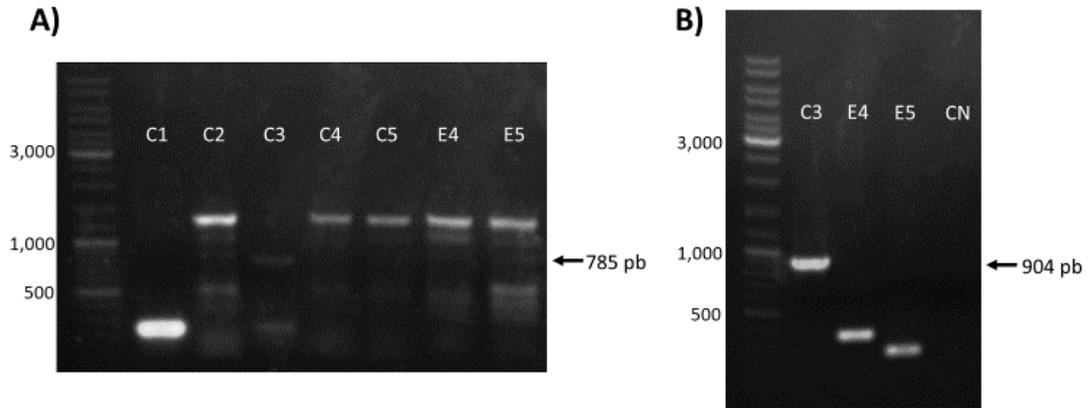
La fusión de los fragmentos gpD y E-DIII se realizó mediante PCR de 2 pasos. En el primer paso, se amplificaron los fragmentos gpD y EDIII adicionándoles un linker y la región de homología (sitio TEV) en los extremos 5' y 3', de cada fragmento respectivamente. Se puede observar las bandas de 421 pb y 385 pb correspondientes a gpD (F1) y E-DIII (F2) respectivamente (Figura 10A). Para el segundo paso, se mezclaron cantidades iguales de cada uno de los fragmentos y se amplificó con oligos que flanqueaban la fusión completa, dando como resultado un fragmento del tamaño de 785 pb (Figura 10B). El análisis *in-silico* nos muestra

la organización de la fusión de genes con los segmentos gpD y EDIII en 5' y 3' correspondientes; el linker conteniendo el sitio para corte por la proteasa TEV; así como los sitios de corte para enzimas de restricción en el linker (*Pst*I, *Xho*I y *Xba*I) y flanqueando la construcción (*Eco*RI, *Hind*III y *Sac*I) (Figura 10C). La fusión obtenida será llamada a partir de ahora como D-EDIII.



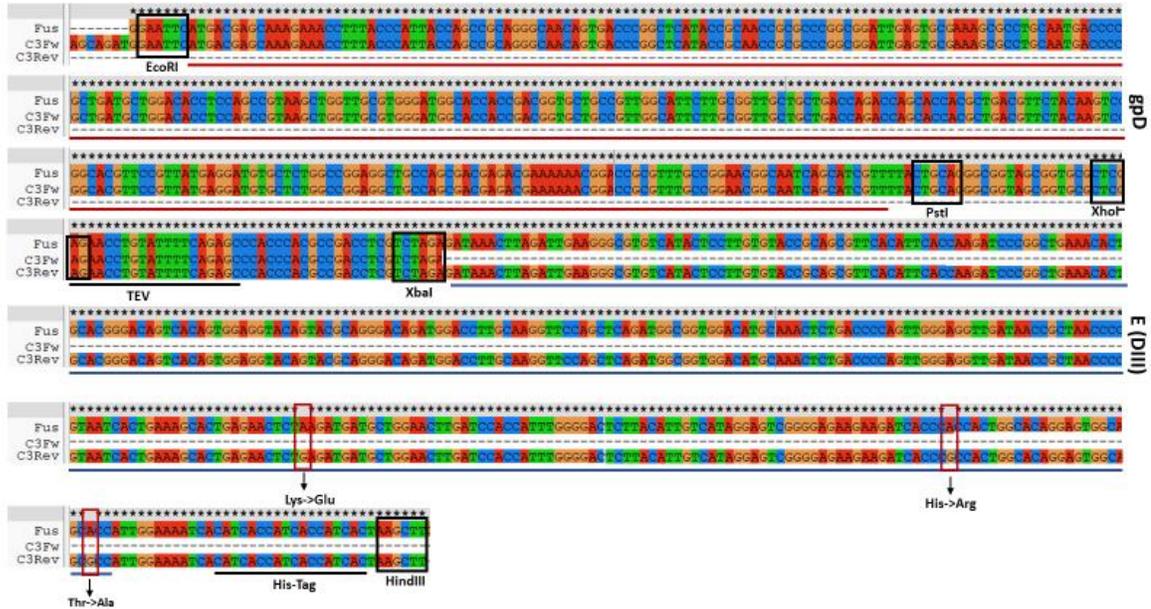
**Figura 10: Fusión de genes mediante PCR de 2 pasos.** El primer paso (A) se realizó para generar los fragmentos a fusionar (F1 y F2). Los fragmentos de 421 pb y 385 pb corresponden los tamaños esperados. El segundo paso (B) se realizó usando oligos que flanquean a la construcción dando un fragmento de 785 pb. (C) Diagrama final de la construcción con las características más importantes resaltadas.

El fragmento obtenido se clonó en pJET1.2 y fue transformado en DH5 $\alpha$ . De las colonias obtenidas, se seleccionaron 7 candidatas y se evaluaron mediante “Colony PCR” utilizando los oligos con los que fue realizada la fusión. De estas, sólo la candidata pJET-D-EDIII C3 generó una banda del tamaño esperado (785 pb) (Figura 11A). Las candidatas pJET -D-EDIII E4 y pJET-D-EDIII E5 presentaron una banda del mismo tamaño; sin embargo, se pudo apreciar bandas inespecíficas en estos amplificadas. Para corroborar la presencia del inserto, se repitió la prueba utilizando los oligos provistos por el kit de ClonJET. Estos oligos se unen a una región externa al sitio en donde se inserta el fragmento en pJET1.2 por lo que el amplificado esperado es más grande (904 pb). Únicamente en el amplificado de la candidata C3 se pudo observar la banda esperada (Figura 11B).



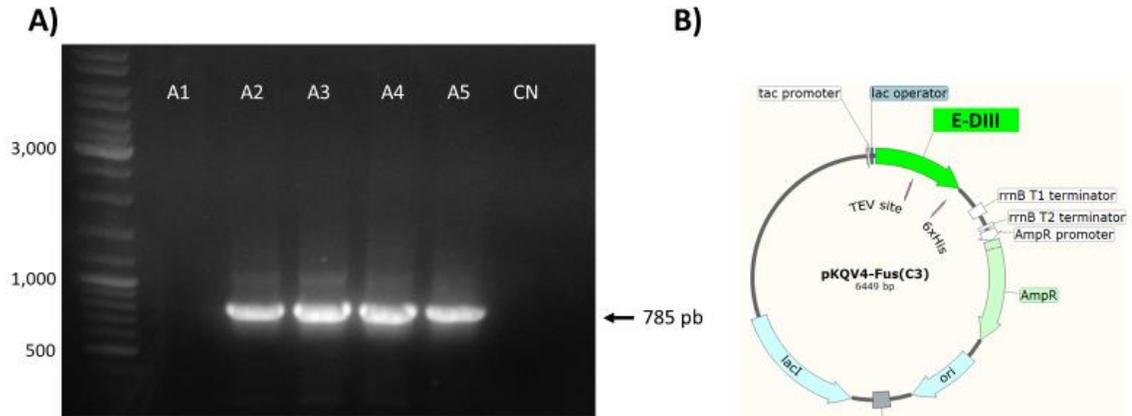
**Figura 11: Comprobación de candidatas pJET-D-EDIII.** (A) "Colony PCR" de las 8 candidatas obtenidas de la clonación de la fusión D-EDIII en el vector pJET1.2. La amplificación del fragmento se llevó a cabo con los oligos utilizados para llevar a cabo la fusión. Puede observarse que tanto las candidatas C3, E4 y E5 generan el fragmento de 785 pb correspondiente a la fusión. B) "Colony PCR" de comprobación de las candidatas previamente seleccionadas (C3, E4 y E5) utilizando los oligos de pJET1.2 los cuales aumentan el tamaño del amplificado a 904 pb. Puede observarse que única candidata real es la C3.

Se secuenció el plásmido pJETD-EDIII obtenido de la candidata C3 utilizando los oligos provistos por el kit ClonJET. Debido al tamaño del fragmento se tuvo que realizar la secuenciación utilizando tanto el oligo Fw como el oligo Rv. Ambas secuencias obtenidas se alinearon con la secuencia de referencia obtenida *in-silico* (Figura 12). En este alineamiento se puede observar que los sitios de corte por las enzimas, las regiones TEV y el Tag 6xHis así como la región correspondiente al gen gpD se encuentran sin cambios. Sin embargo, en la región correspondiente al DIII de zika se encontraron mutaciones adicionales a la ya antes observada; todas estas mutaciones generan cambios en aminoácidos (K212E, H237R y T245A) (Figura 12).



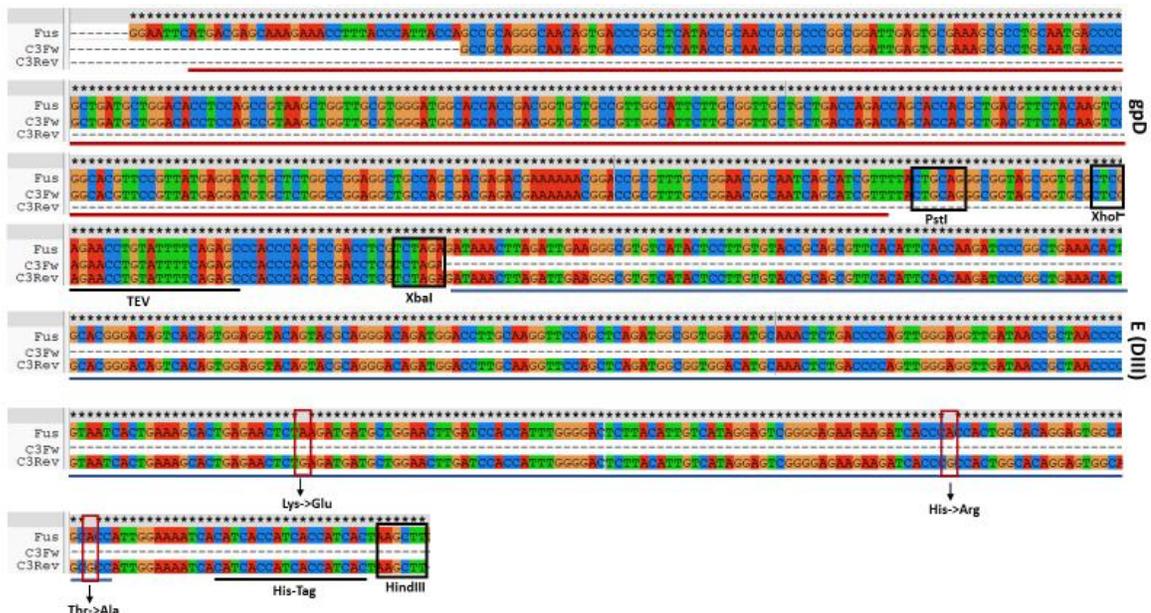
**Figura 12: Secuenciación de la candidata C3 de pJET-D-EDIII.** Secuencia de la candidata C3 usando oligo Fw (carril 2) y oligo Rv (carril 3) comparada con la secuencia obtenida *in-silico* del vector pJET-D-EDIII (renglón 1). En cuadros negros se observa los sitios de corte para enzimas de restricción; marcado con líneas los segmentos correspondientes a gpD (roja), EDIII (azul), TEV y Tag 6xHis (negro): las mutaciones encontradas en la región EDIII se encuentran encuadradas en rojo con la modificación de aminoácidos abajo.

La construcción D-EDIII se clonó posteriormente en el vector de expresión pKQV4 para generar el vector pD-EDIII utilizando las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. El vector ligado fue transformado en DH5 $\alpha$  y se seleccionaron 5 candidatas de las 25 obtenidas, las cuales fueron analizadas mediante “Colony PCR” utilizando los oligos que flanquean la construcción. De estas candidatas, 4 generaron la banda de 785 pb esperada (Figura 13A) y se seleccionó a la candidata A5 para ser secuenciada. El vector de expresión resultante se nombró como pD-EDIII (Figura 13B).



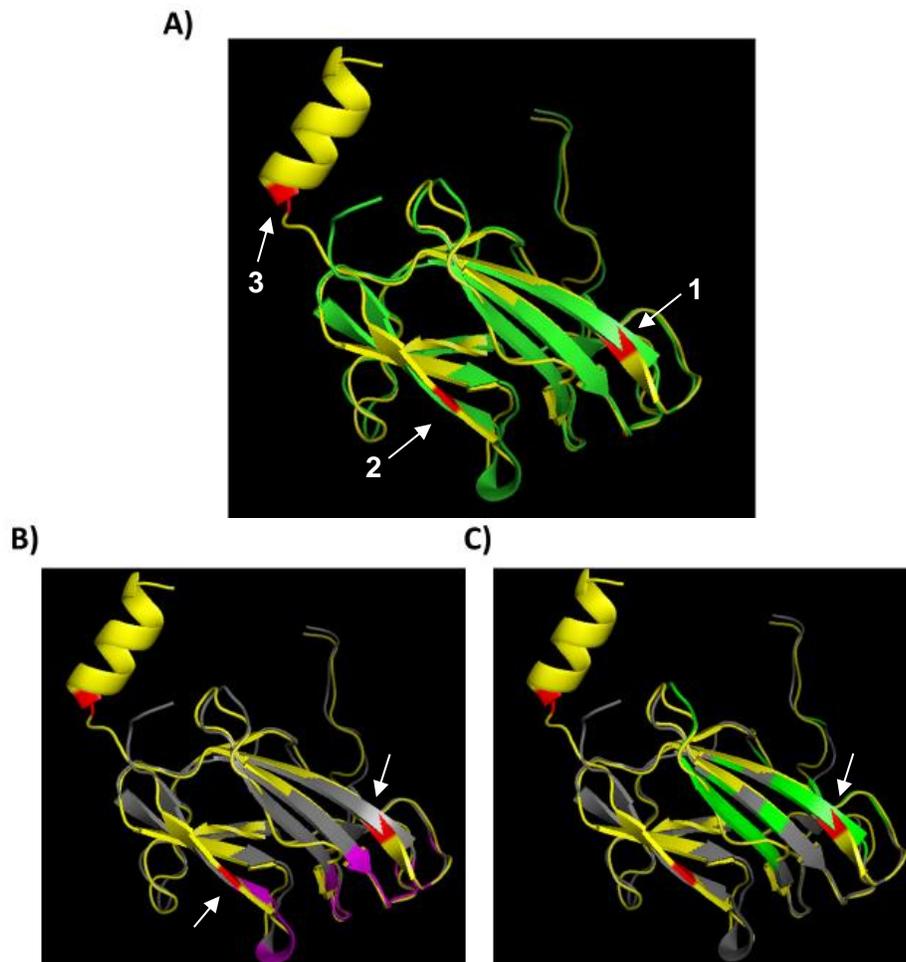
**Figura 13: Comprobación de candidatas pD-EDIII.** (A) "Colony PCR" de 5 candidatas obtenidas de la clonación de la fusión D-EDIII en el vector pKQV4. Puede observarse 4 de las 5 candidatas generan el fragmento de 785 pb correspondiente a la fusión. (B) Vector pD-EDIII diseñado *in-silico*.

Al igual que la secuenciación del fragmento D-EDIII en pJET, el tamaño del fragmento requirió el uso de 2 oligos para poder cubrir la secuencia completa. Se utilizaron el oligoE Fw y pKQV4 Rv. El uso del oligo Fw impidió la lectura de las primeras bases de la construcción; sin embargo, la secuencia restante pudo ser leída sin problemas. De igual manera que en el vector pJET-D-EDIII, se encontraron las mismas mutaciones que generan cambios de aminoácidos en la secuencia anterior (Figura 14).



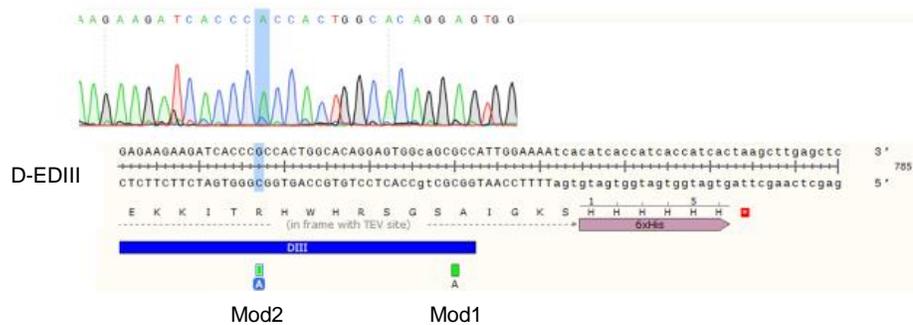
**Figura 14: Secuenciación de candidata de pD-EDIII.** Secuencia de la candidata A5 usando oligo E Fw (carril 2) y oligo pKQV4 Rv (carril 3) comparada con la secuencia obtenida *in-silico* del vector pD-EDIII (renglón 1). En cuadros negros se observa los sitios de corte para enzimas de restricción; marcado con líneas los segmentos correspondientes a gpD (roja), EDIII (azul), TEV y Tag 6xHis (negro); las mutaciones encontradas en la región EDIII se encuentran encuadradas en rojo con la modificación de aminoácidos abajo.

Con el fin de identificar si las mutaciones en la construcción D-EDIII generaban un cambio en la estructura del EDIII, se realizó el modelado de este fragmento con I-TASSER. El modelo obtenido se comparo con la estructura cristalizada de la proteína E de ZIKV (PDB: 5JHM) (Figura 15A). Aun con 3 cambios de aminoácidos, la estructura general de la proteína no revelo grandes cambios; sin embargo, al analizar los epitopes estructurales previamente reportados en este dominio (Zhao, 2016), se observó que las mutaciones K212E y H237R se encontraban adyacentes al epitope LR (Figura 15B) y la mutación K212E dentro del epitope ABDE (Figura 15C) respectivamente.



**Figura 15: Análisis estructural de EDIII en construcción D-EDIII.** (A) Superposición del modelo obtenido con I-TASSER de EDIII en amarillo y EDIII wt en verde (PDB: 5JHM). En rojo se encuentran marcados los aminoácidos que fueron sustituidos 1: K212E, 2: H237R y 3: T245A. (B) En rosa se marcaron los aminoácidos pertenecientes al epitope estructural LR. Las mutaciones K212E y H237R se encuentran adyacentes a dicho epitopes. (C) En verde se encuentra marcado el epitope estructural ABDE. La mutación K212E se encuentra dentro de los aminoácidos que conforman este epitope.

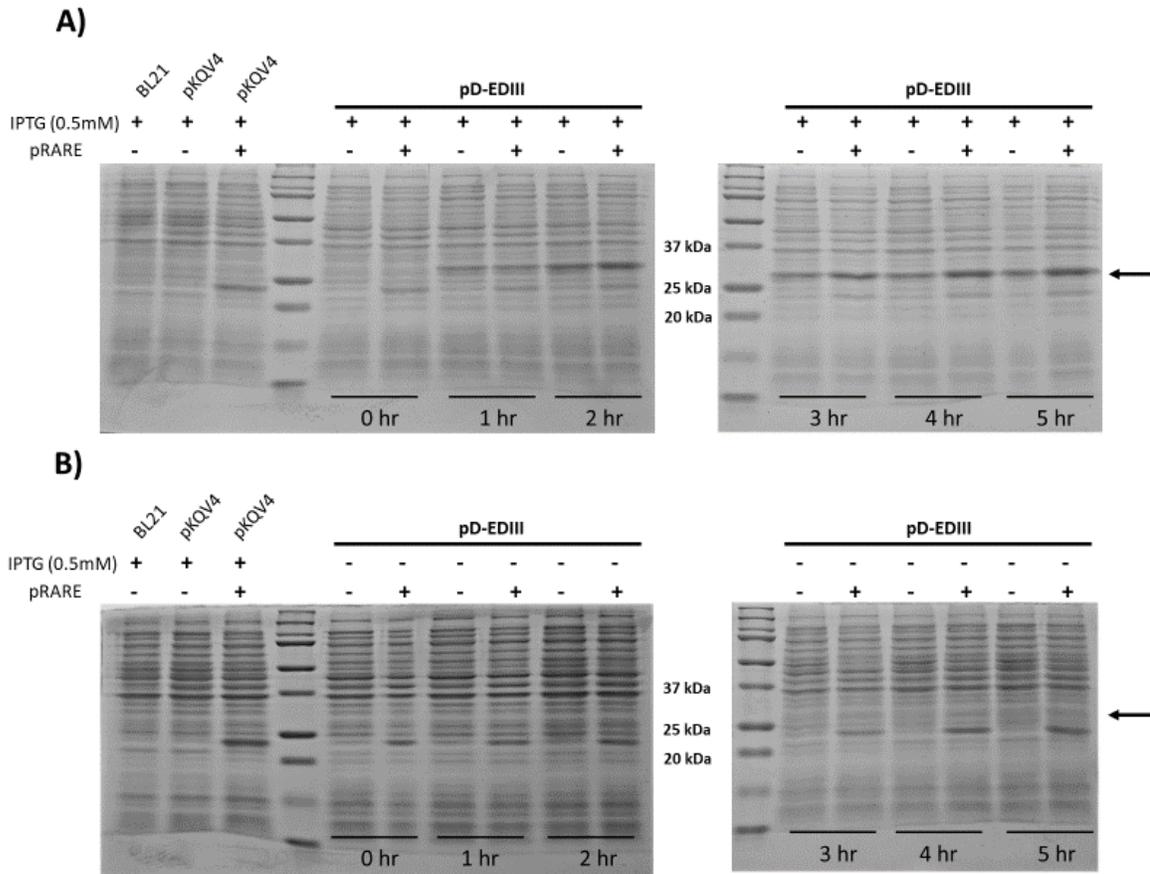
Debido al propósito de la construcción, se decidió corregir las mutaciones que generan cambios de aminoácidos mediante mutagénesis sitio-dirigida. Posterior a cada mutagénesis, el vector pD-EDIII se transformó en DH5 $\alpha$  para su amplificación. De las candidatas obtenidas de cada transformación se seleccionaron 5 y se secuenciaron. De la mutación Mod2, 2 de las candidatas obtuvieron la corrección deseada (Figura 16).



**Figura 16: Mutagénesis sitio-dirigida en D-EDIII.** Se muestra el extremo 3' de la construcción D-EDIII. Los cuadros verdes en la parte inferior ubican las mutaciones a realizar mediante mutagénesis sitio-dirigida. El segmento de electroferograma muestra el cambio de G por A realizado en la mutación Mod2.

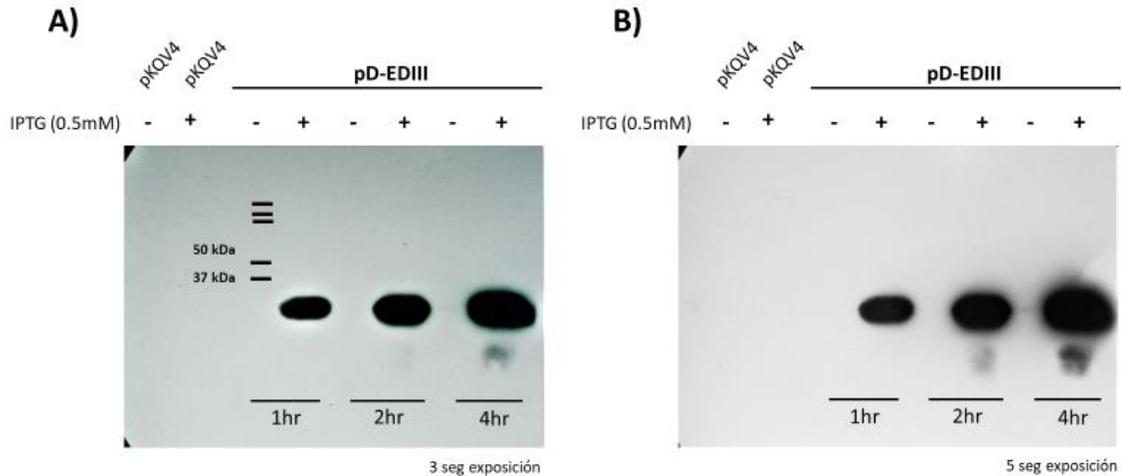
## 1.26 Inducción de la proteína D-EDIII

La expresión de la proteína D-EDIII se observó después de realizar la inducción con 0.5 mM de IPTG en BL21, por 1, 2, 3, 4 y 5 hrs. El ensayo se realizó evaluando al mismo tiempo el efecto con el vector pRARE, debido a la proporción de codones raros presentes en el fragmento EDIII de la proteína de fusión (Anexo 1). En los geles de proteínas inducidos (Figura 17A) se puede observar la aparición de una banda de alrededor de 27.3 kDa la cual corresponde al tamaño estimado para D-EDIII; esta banda no se encuentra en los geles de proteína sin inducir (Figura 17B). La expresión de la proteína de fusión aumenta gradualmente a lo largo de las 5 hrs de inducción, y puede observarse una ligera pero mayor concentración cuando la cepa es suplementada con pRARE (Figura 17A).



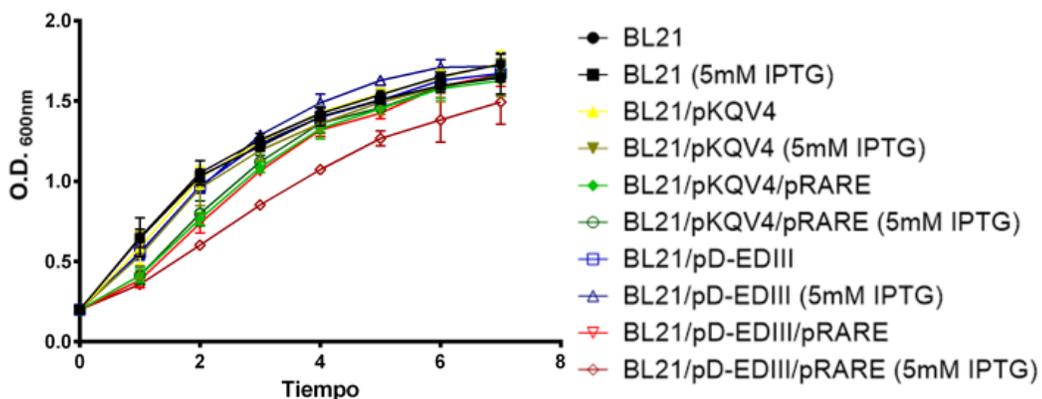
**Figura 17: Expresión de la proteína D-EDIII.** Geles de poliacrilamida 13% (A) Cepas inducida con 0.5 mM de IPTG. En los 3 primeros carriles se observan los controles de BL21, BL21/pKQV4 y BL21/pKQV4/pRARE; en los siguientes carriles se observa en parejas las cepas BL21/pD-EDIII y BL21/pD-EDIII/pRARE a 1, 2, 3, 4 y 5 hrs. (B) Cepas no inducidas. Las cepas se encuentran organizadas de la misma manera que en el panel (A).

La inmuno-detección se realizó a partir de las muestras utilizadas para el ensayo previo, pero utilizando los tiempos de inducción de 1, 2 y 4 hrs. En el Western-blot (WB), se muestra la cepa BL21 transformada con pD-EDIII tanto con cómo sin inducción (Figura 18). Las placas radiográficas se expusieron de 3 (Figura 18A) y 5 (Figura 18B) segundos respectivamente pudiendo observarse las bandas correspondientes a la proteína D-EDIII del tamaño esperado (27.3 kDa). Puede observarse que la proteína sin inducción es capaz de observarse a las 4 horas (Figura 18B).



**Figura 18: Inmunodetección de la proteína D-EDIII.** Detección de la proteína D-EDIII mediante Western-blot. (A) Placa radiográfica expuesta por 3 segundos; se observa una gran cantidad de proteína la cual va aumentando a medida que aumenta el tiempo de inducción. La banda observada se encuentra dentro del tamaño esperado (27.3 kDa). (B) Placa radiográfica expuesta a la misma membrana por un tiempo de 5 seg; se puede observar aquí que adicionalmente a las bandas observadas en el panel anterior, se muestra una banda en el carril perteneciente al vector Pd-EDIII no inducido a las 4 hrs.

Se realizó una curva de crecimiento para determinar la influencia que tiene la proteína D-EDIII en el crecimiento bacteriano. Se pudo observar que la bacteria transformada con el plasmido pD-EDIII tanto con cómo sin inducción mantiene un crecimiento similar a la cepa BL21. Sin embargo, tanto la cepa transformada con pKQV4/pRARE como la transformada con pD-EDIII/pRARE muestran un ligero rezago en el crecimiento, siendo la pD-EDIII/pRARE inducida la que muestra el mayor retraso de crecimiento (Figura 19).

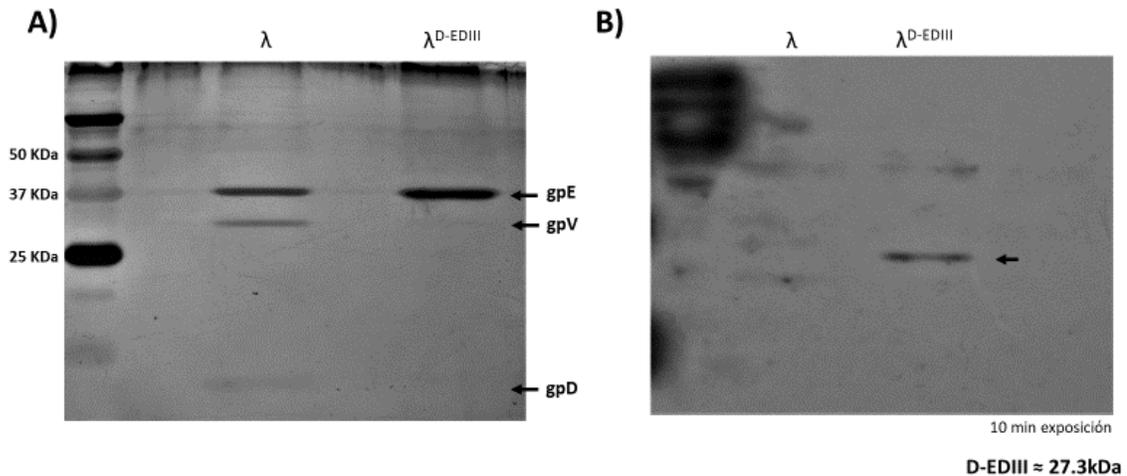


**Figura 19: Curva de crecimiento BL21/pD-EDIII.** La curva de crecimiento nos indica que la expresión del vector pD-EDIII con 0.5 mM de IPTG no genera un efecto tóxico en la cepa. Sin embargo, es la cepa cotransformada con los vectores pD-EDIII y pRARE muestra un ligero retraso en el crecimiento. Las otras cepas en las que el vector pRARE se encuentra presente también muestran un retraso de crecimiento mínimo.

## 1.27 Ensamblaje del fago $\lambda^{D-EDIII}$

Para el ensamblaje del fago con la proteína gpD modificada, se utilizó la cepa BL21 transformada con pD-EDIII e inducida (0.5 mM IPTG) O/N. Esta cepa fue infectada con un fago  $\lambda$  y se realizó un gel de proteínas de los fagos purificados mediante PEG-8000 (Figura 20A). Este gel fue revelado mediante tinción de plata y es posible observar algunas de las proteínas mayoritarias de cápside tanto de  $\lambda$  como de  $\lambda^{D-EDIII}$ . Sin embargo, no es posible observar alguna banda diferente en el fago  $\lambda^{D-EDIII}$  (Figura 20A).

La inmuno-detección de la proteína D-EDIII se llevó a cabo con las mismas muestras con el objetivo de identificar si la proteína D-EDIII se encuentra formando parte del virión. Se puede observar la presencia de una banda del tamaño esperado (27.3 kDa) en el carril correspondiente a  $\lambda^{D-EDIII}$ ; esto con un tiempo de revelado de 10 min (Figura 20B).

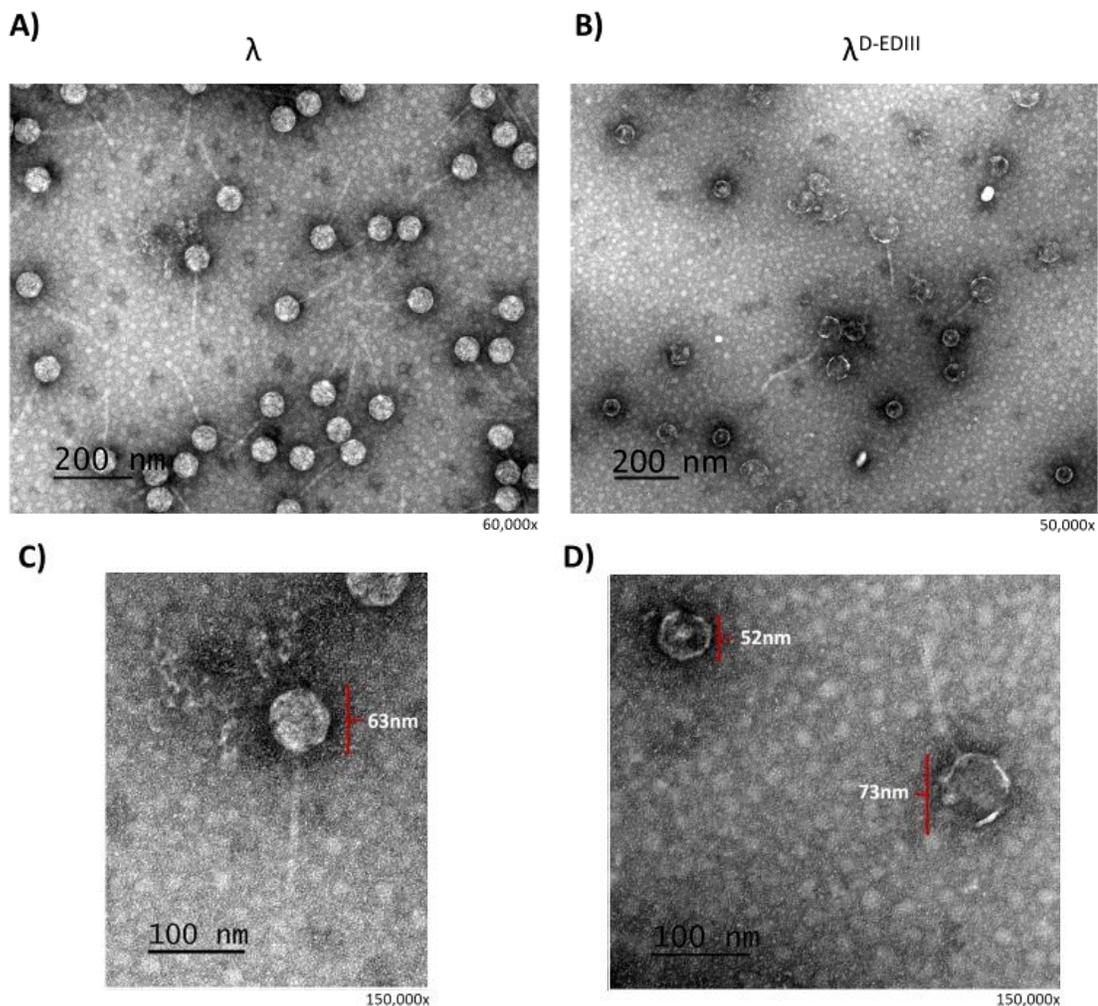


**Figura 20: Proteínas en  $\lambda^{D-EDIII}$  purificado mediante PEG-8000.** (A) Perfil de proteínas de los viriones de  $\lambda$  y  $\lambda^{D-EDIII}$  en un gel de poliacrilamida al 13% teñido con plata. En ambos fagos pueden observarse bandas pertenecientes a las proteínas mayoritarias de cápside. Sin embargo, no es posible distinguir una banda diferente en el carril de  $\lambda^{D-EDIII}$ . (B) Western-blot de los viriones de  $\lambda$  y  $\lambda^{D-EDIII}$ ; puede observarse una banda del tamaño estimado para D-EDIII (27.3kDa) exclusivamente en el carril perteneciente a  $\lambda^{D-EDIII}$ .

Los fagos obtenidos a partir de PEG-8000 fueron purificados nuevamente usando gradientes de CsCl. Estos fueron observados mediante microscopía electrónica con el objetivo de evaluar la morfología de ambos fagos. Se puede observar diferencias a simple vista entre el fago  $\lambda$  (Figura 21A/C) y el fago  $\lambda^{D-EDIII}$  (Figura 21B/D).

En comparación con el fago  $\lambda$ , el cual presenta una cápside uniforme de aproximadamente 63 nm de diámetro (Figura 21C), el fago  $\lambda^{\text{D-EDIII}}$  presenta 2 poblaciones de cápsides: por un lado, cápsides pequeñas (51 nm), vacías y que no presentan tallo unido al virión; por el otro lado, cápsides de tamaño variable las cuales presentan tallo unido, pero que parecen encontrarse rotas (Figura 21D).

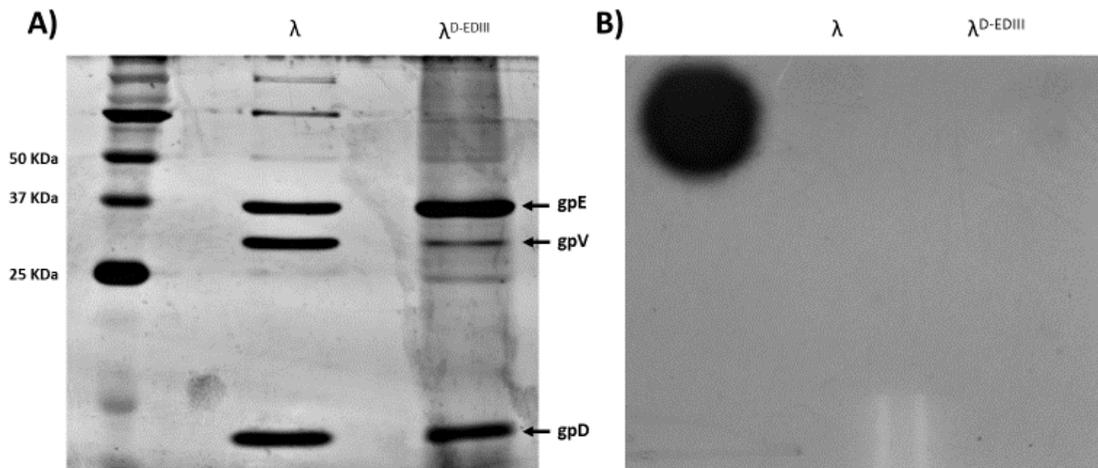
Al observar estas diferencias de cerca y al realizar las mediciones de las cápsides fue posible determinar el tamaño, así como posible ausencia de material genómico en el interior de la cápside.



**Figura 21: Microscopía electrónica de  $\lambda^{\text{D-EDIII}}$ .** Fago  $\lambda$  a 60,000 (A) y 150,000 aumentos (C). Este fago presenta una morfología homogénea y posee una cápside de alrededor de 63 nm (C). El fago  $\lambda^{\text{D-EDIII}}$  a 50,000 (B) y 150,000 aumentos (B). Este fago posee una doble morfología; por un lado, cápsides vacías (oscuras) de un tamaño de 52 nm (D) y por el otro lado fagos maduros con apariencia colapsada con un tamaño de cápside promedio de 73 nm (D).

Al igual que los fagos purificados con PEG-8000 se realizó un gel de proteínas para analizar las muestras de fagos purificados por CsCl. Este gel fue revelado mediante tinción de plata y, aun cuando es posible observar en una mayor concentración las proteínas mayoritarias de cápside gpE, gpV y gpD, no es posible distinguir una banda perteneciente al tamaño de D-EDIII (Figura 22A).

Se realizó la inmuno-detección de estas muestras; sin embargo, no es posible observar bandas que indiquen la presencia de la proteína D-EDIII en los fagos  $\lambda^{D-EDIII}$  (Figura 22B).



**Figura 22: Proteínas en  $\lambda^{D-EDIII}$  purificado mediante CsCl.** (A) Perfil de proteínas de los viriones de  $\lambda$  y  $\lambda^{D-EDIII}$  en un gel de poliacrilamida al 13% teñido con plata. En ambos fagos pueden observarse bandas pertenecientes a las proteínas mayoritarias de cápside. Sin embargo, no es posible distinguir una banda diferente en el carril de  $\lambda^{D-EDIII}$  que corresponda al tamaño esperado para la proteína D-EDIII. (B) Western-blot de los viriones de  $\lambda$  y  $\lambda^{D-EDIII}$  en el cual no es posible observar la presencia de la banda que corresponda a la proteína D-EDIII.

## Discusión

La proteína E, localizada en el exterior de la membrana de los viriones maduros de ZIKV, es una de las proteínas virales más susceptibles a ser reconocida por anticuerpos (Pierson, 2016) y por lo mismo, una opción a elegir para el desarrollo de una vacuna. Hasta el momento, la mayoría de las vacunas en desarrollo se basan en la utilización de esta proteína, ya sea en forma del virión completo inactivado, en forma de DNA/RNA o a manera de proteína soluble (DeFrancesco, 2016; Shan, 2017; Alam, 2017). Estas vacunas han sido reportadas como altamente inmunogénicas y capaces de generar protección contra la infección viral tanto en cultivos celulares como *in vivo* (Barouch, 2017). Sin embargo, aun cuando estas vacunas son prometedoras, existen cuestiones de seguridad que parecen pasar por alto (Yang, 2017).

La gran similitud que existe entre los virus de dengue y zika es el principal motivo de preocupación en cuestión de seguridad debido al potenciamiento de la infección mediada por anticuerpos (antibody dependent enhancement; ADE) que ha sido reportado en diferentes arbovirus. Este potenciamiento se reportó inicialmente para DENV y sus 4 serotipos, en donde los anticuerpos generados por el paciente durante una infección primaria son capaces de generar protección contra el mismo serotipo. Sin embargo, en una infección secundaria por un serotipo diferente, los anticuerpos se comportan como no-neutralizantes o sub-neutralizantes; en este caso, los anticuerpos son capaces de reconocer y unirse al virus pero su unión se lleva a cabo en bajas concentraciones o con una baja afinidad lo que lleva a la opsonización del virus sin neutralizar facilitando su entrada a células del sistema inmune. Este reconocimiento cruzado e ineficazmente neutralizante puede potenciar la infección del segundo serotipo en células que expresan el receptor Fcγ

lo que puede llevar a un shock letal (Halstead, 2014; Pierson, 2016; Katzelnick, 2017).

Existen reportes previos en los cuales se demuestra que los anticuerpos generados contra ZIKV o DENV son capaces de generar ADE tanto en cultivos *in vitro* como en modelos animales (Barouch, 2017; Dejnirattisai, 2016). Además, este evento se ha reportado al utilizar una vacuna contra el virus de la encefalitis japonesa (JEV); los pacientes vacunados contra este virus mostraron ADE para los 4 serotipos de DENV (Saito, 2016). Estas razones, junto al hecho de que tanto zika como dengue co-circulan en una misma región geográfica y comparten un vector de transmisión genera la necesidad de crear una vacuna que no solo sea capaz de proteger ante una infección, sino que a su vez disminuya la probabilidad de potenciamiento de la infección de un flavivirus secundario (Rouvinski, 2017; Culshaw, 2017).

La proteína E se encuentra altamente conservada entre diferentes flavivirus (ZIKV, DENV, WNV). Esta similitud explica la capacidad de los anticuerpos para reconocer de manera cruzada a diferentes flavivirus, en especial DENV (Barouch, 2017; Keasey, 2017). Estudios estructurales reportan que el loop de fusión (LF) en la región E-DII contiene la mayoría de los residuos conservados y altamente expuestos entre la proteína E de zika y la de otros flavivirus. Aproximadamente un 70% de los anticuerpos que se generan en una infección por uno de estos virus reconocen esta región y además, la mayoría de los anticuerpos sub-neutralizantes tiene como blanco esta región o epitopes en EDII o EDI (Rouvinski, 2017; Dai, 2016). Por el contrario, los anticuerpos que reconocen el EDIII se han mostrado altamente específicos, con una fuerte actividad neutralizante (Dai, 2016) y son capaces de proteger a ratones de un reto viral contra ZIKV sin generar ADE (Zhao, 2016;).

La alta inmunogenicidad de E-DIII y su capacidad de generar anticuerpos neutralizantes fue el motivo principal para elegirlo como el epitope en la construcción de esta vacuna. Sin embargo, también se tomó en cuenta los reportes que indican que los DIII de las proteínas E de diferentes flavivirus son capaces de plegarse de manera independiente en un dominio funcional (Yang, 2017; He, 2014).

El diseño del sistema de *phage display* en este trabajo, el cual despliega el E-DIII de ZIKV a modo de vacuna responde a diferentes necesidades actuales a nivel mundial. En primera: al ser una vacuna de péptidos acoplados a un vector viral procarionte posee un mejor perfil de seguridad. Al contrario de vacunas de DNA, no existe el riesgo de una posible inserción genómica u oncogénesis asociada a este evento; además, al tratarse de un virus incapaz de replicarse en células eucariotas evita la posible reversión de la inactivación observada en vacunas con patógenos inactivados (Yang, 2017). En segundo: se genera un sistema fácilmente manipulable y con una producción más rápida y barata que con otros sistemas. En tercero, el acoplamiento al fago puede favorecer la respuesta inmune del organismo, así como darle estabilidad a la vacuna y facilitar su purificación. Finalmente, al evitar usar epitopes blanco de anticuerpos no neutralizantes y que puedan generar reconocimiento cruzado con otros flavivirus, se busca disminuir la posibilidad de generar ADE en regiones geográficas con flavivirus co-circulantes (Yang, 2017).

En este trabajo puede observarse una acumulación de mutaciones en el EDIII. La primera de estas mutaciones se mostró al secuenciar la construcción pJET-E-DIII. Una vez realizada la fusión gpD-EDIII y al secuenciar la construcción pJET-D-EDIII, se puede observar que en la porción correspondiente a EDIII se habían generado 2 nuevas mutaciones. Esto es interesante ya que las 3 mutaciones observadas fueron cambios de adenina por citocina y estas se identificaron posterior al pase de la secuencia por el vector de transición pJET. Además, ni el vector pJET-gpD ni la porción gpD de la fusión de genes presentaron ninguna mutación posterior a su manipulación.

Debido a que todas las mutaciones observadas en E-DIII generan cambios de aminoácidos con diferentes características, se realizó el modelaje de la porción E-DIII para poder darnos una idea de si estas mutaciones afectaban la estructuración del DIII y por consiguiente no pudiera ser reconocida por anticuerpos contra este dominio. De acuerdo al modelado, no se observó ningún cambio significativo en la estructura de E-DIII pero en un análisis más a fondo, se observó que estos cambios

de aminoácidos se encontraban dentro o inmediatamente adyacentes a 2 de los epitopes estructurales identificados previamente (Zhao, 2016). Ya que se trata de epitopes conformacionales y que son blanco de anticuerpos neutralizantes los cuales se busca generar al usar esta vacuna, se tomó la decisión de corregir las mutaciones.

En este trabajo, la presencia de la proteína D-EDIII se analizó mediante ensayos de Western-blot y microscopia electrónica. El primero para observar la presencia de la proteína de fusión dentro de las proteínas de cápside y el segundo para determinar si la presencia de esta proteína generaba problemas en el ensamblaje de la cápside de  $\lambda$ .

Mediante Western-blot se determinó que la cantidad de proteína de fusión que es incorporada a los viriones maduros de  $\lambda$  es escasa. Esto se muestra por la banda de proteína la cual solo fue observada después de un tiempo de 10 min de exposición. Esta baja cantidad de proteína desplegada indica que o bien la proteína de fusión no se encuentra en la concentración adecuada para competir, con la proteína wt, por un sitio en la cápside viral, o bien, el dominio de fusión está generando un cambio estructural o impedimento estérico el cual afecte la unión de la fusión a la cápside.

En los resultados observados en la microscopia electrónica podemos ver que el fago  $\lambda^{D-EDIII}$  presenta defectos en el ensamblaje del virión. Esto puede observarse en la gran cantidad de pro-cápsides vacías, así como con la presencia de fagos maduros los cuales parecen haber colapsado. La presencia de un gran número de pro-cápsides vacías se ha reportado previamente al observar un fago  $\lambda$  deficiente en gpD (Dokland, 1993) ya que, al no encontrarse la proteína encargada de la estabilidad de la cápside, el genoma no es encapsidado. Esto nos indica que tampoco se encuentra la proteína wt disponible en una concentración adecuada para poder permitir la maduración adecuada del fago. Por otro lado, la presencia de fagos maduros colapsados, nos indica que su genoma fue encapsidado y que, la cápside no es capaz de soportar la presión ocasionada por este empaquetamiento de DNA.

Una de las razones por las cuales la proteína de fusión gpD-EDIII podría estar impidiendo el correcto ensamblaje del fago puede ser por la localización del fragmento fusionado, ya que si esta se ubica entre la interfase cápside-gpD se podría generar impedimento estérico el cual afectaría la maduración de la cápside. Este inconveniente se intentó evitar desde el diseño inicial de la construcción, por lo que la fusión se realizó en el extremo carboxilo de la proteína. De acuerdo con análisis de cristalografía, este extremo no se encuentra involucrado en la interacción con la cápside y, aun cuando se encuentra orientado hacia esta, se ubica más cercano al solvente, en comparación con el extremo amino terminal (Lander, 2009). Además, se diseñó un linker para unir las proteínas (24 aminoácidos) el cual es mayor al tamaño mínimo reportado para este tipo de fusiones usando gpD (Gamage, 2009) y el cual tiene características flexibles (Chen, 2013); estas características lo que debería ser suficiente para evitar el impedimento estérico.

Pese al diseño, el fragmento parece no permitir la correcta unión de gpD, por lo que son necesarios ensayos con el fin de determinar el causante de dicha desestabilización. Un ensayo que nos puede ayudar a determinar si se trata de impedimento estérico, se basa en la decoración *in-vitro* de cápsides de  $\lambda$ . En trabajos previos, se ha reportado que este tipo de ensayos permite la decoración con proteínas fusionadas de hasta 425 aa manteniendo una unión de gpD-fusión similar a la vista para gpD wt (Yang, 2000).

Por otro lado, el despliegue del fragmento EDIII en la conformación adecuada es de gran importancia en el proyecto ya que se busca la construcción de una vacuna. Trabajos previos han demostrado la capacidad de *E. coli* para la producción recombinante de E-DIII de ZIKV. Sin embargo, la proteína se acumula en cuerpos de inclusión por lo que debe ser solubilizada y reestructurada previo a su uso (Han, 2017; Yang, 2017). Al contrario de estos trabajos, nosotros pudimos observar que la fusión de gpD-EDIII es capaz de producirse en gran cantidad manteniendo a la proteína de manera soluble, lo que evita la necesidad de purificar y reestructurar la proteína previo a la decoración del fago. Un evento similar ocurre al intentar

expresar la proteína E completa de DENV en *E. coli*: esta proteína al sobre-expresarse se obtiene en cuerpos de inclusión (Dai, 2016); sin embargo, al fusionarse a GST, esta proteína es capaz de obtenerse de manera soluble y con la conformación adecuada para ser reconocida por anticuerpos (Sugrue, 1997). Aun teniendo la proteína soluble, es necesario la realización de pruebas para poder asegurar que este dominio tiene la conformación adecuada para ser reconocido por anticuerpos contra esta región.

## Conclusión

Aun cuando la tecnología de *phage display* presenta un gran número de ventajas, existen desventajas o puntos a superar para llevarla a cabo de una manera eficiente, especialmente si se piensa en el “display” a manera de vacuna. Una de las más importantes es el despliegue del epítopo en la concentración y conformación adecuada para que sea capaz de despertar una respuesta inmune (Bazan, 2012). En este trabajo aun no se ha definido si la porción de E-DIII es capaz de desplegarse de manera correcta y eficiente en la superficie de la cápside para despertar una respuesta inmune.

## Perspectivas

- Identificar la causa que genera el ensamblaje incorrecto del fago  $\lambda^{D-EDIII}$ .
- Optimizar la concentración de proteína D-EDIII desplegada en el sistema.
- Analizar la conformación estructural de EDIII tanto en la proteína D-EDIII como en el fago  $\lambda^{D-EDIII}$ .
- Optimizar el proceso de producción y purificación para el fago  $\lambda^{D-EDIII}$ .
- Identificar mutantes con una mayor capacidad de despliegue.
- Realizar pruebas inmunológicas correspondientes para determinar la función de  $\lambda^{D-EDIII}$  como vacuna.

# Bibliografía

- Adhya, Sankar, Carl R Merrill, and Biswajit Biswas. 2014. "Therapeutic and Prophylactic Applications of Bacteriophage Components in Modern Medicine." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 4 (1): a012518–a012518. doi:10.1101/cshperspect.a012518.
- Alam, Aftab, Nikhat Imam, Anam farooqui, Shahnawaz Ali, Md Zubair Malik, and Romana Isirat. 2017. "Recent Trends in ZikV Research: A Step Away from Cure." *Biomedicine and Pharmacotherapy* 91. Elsevier Masson SAS: 1152–59. doi:10.1016/j.biopha.2017.05.045.
- Barouch, Dan H., Stephen J. Thomas, and Nelson L. Michael. 2017. "Prospects for a Zika Virus Vaccine." *Immunity* 46 (2). Elsevier Inc.: 176–82. doi:10.1016/j.immuni.2017.02.005.
- Bastien, Nathalie, Michel Trudel, and Claire Simard. 1997. "Protective Immune Responses Induced by the Immunization of Mice with a Recombinant Bacteriophage Displaying an Epitope of the Human Respiratory Syncytial Virus." *Virology* 234 (1): 118–22. doi:10.1006/viro.1997.8632.
- Bazan, Justyna, Ireneusz Całkosiński, and Andrzej Gamian. 2012. "Phage Display—A Powerful Technique for Immunotherapy." *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 8 (12): 1817–28. doi:10.4161/hv.21703.
- Beghetto, Elisa, and Nicola Gargano. 2011. "Lambda-Display: A Powerful Tool for Antigen Discovery." *Molecules* 16 (4): 3089–3105. doi:10.3390/molecules16043089.
- Brett-Major, D. M., and C. E. Roth. 2016. "Zika Virus, Emergencies, Uncertainty and Vulnerable Populations." *Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh* 46 (1): 3–6. doi:10.4997/JRCPE.2016.102.
- Chen, Xiaoying, Jennica L. Zaro, and Wei-Chiang Shen. 2013. "Fusion Protein Linkers: Property, Design and Functionality." *Advanced Drug Delivery Reviews* 65 (10): 1357–69. doi:10.1016/j.addr.2012.09.039.
- Clark, Jason R., and John B. March. 2006. "Bacteriophages and Biotechnology: Vaccines, Gene Therapy and Antibacterials." *Trends in Biotechnology* 24 (5): 212–18. doi:10.1016/j.tibtech.2006.03.003.
- Clokie, Martha R.J., Andrew D. Millard, Andrey V. Letarov, and Shaun Heaphy. 2011. "Phages in Nature." *Bacteriophage* 1 (1): 31–45. doi:10.4161/bact.1.1.14942.
- Culshaw, Abigail, Juthathip Mongkolsapaya, and Gavin R. Screaton. 2017. "The Immunopathology of Dengue and Zika Virus Infections." *Current Opinion in Immunology* 48. Elsevier Ltd: 1–6. doi:10.1016/j.coi.2017.07.001.

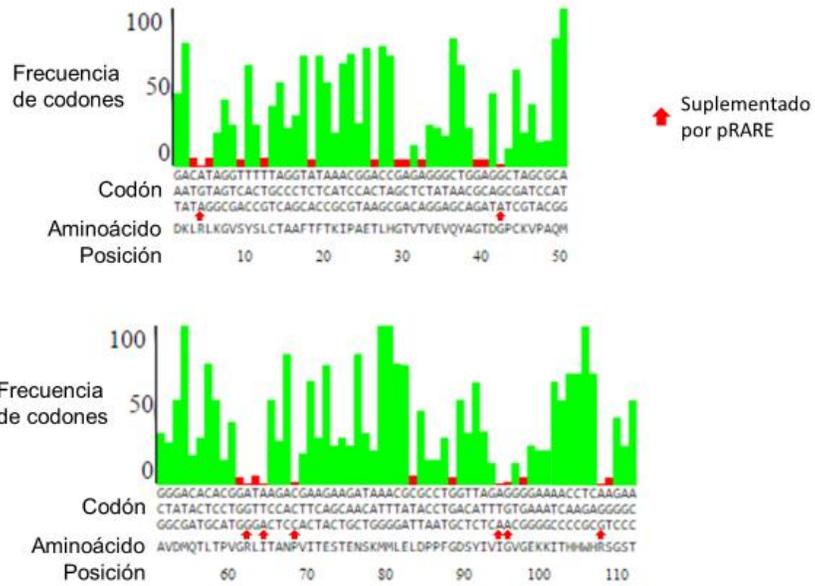
- Dai, Lianpan, Qihui Wang, Jianxun Qi, Yi Shi, Jinghua Yan, and George F. Gao. 2016. "Molecular Basis of Antibody-Mediated Neutralization and Protection against Flavivirus." *IUBMB Life*, 783–91. doi:10.1002/iub.1556.
- la Cruz, V F de, A. A. Lal, and T. F. McCutchan. 1988. "Immunogenicity and Epitope Mapping of Foreign Sequences via Genetically Engineered Filamentous Phage." *The Journal of Biological Chemistry* 263 (9): 4318–22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2450091>.
- DeFrancesco, Laura. 2016. "Zika Pipeline Progresses." *Nature Biotechnology* 34 (11): 1084–86. doi:10.1038/nbt1116-1084b.
- Dejnirattisai, Wanwisa, Piyada Supasa, Wiyada Wongwiwat, Alexander Rouvinski, Giovanna Barba-Spaeth, Thaneeya Duangchinda, Anavaj Sakuntabhai, et al. 2016. "Dengue Virus Sero-Cross-Reactivity Drives Antibody-Dependent Enhancement of Infection with Zika Virus." *Nature Immunology* 17 (9). Nature Publishing Group: 1102–8. doi:10.1038/ni.3515.
- Dokland, T., Murialdo, H. 1993. "Structural Transitions during Maturation of Lambda Capsid--Dokland and Murialdo, 1993.Pdf." *Journal of Molecular Biology*. doi:10.1006/jmbi.1993.1545.
- Elbreki, Mohamed, R. Paul Ross, Colin Hill, Jim O'Mahony, Olivia McAuliffe, and Aidan Coffey. 2014. "Bacteriophages and Their Derivatives as Biotherapeutic Agents in Disease Prevention and Treatment." *Journal of Viruses* 2014: 1–20. doi:10.1155/2014/382539.
- Fogg, P. C. M., H. E. Allison, J. R. Saunders, and A. J. McCarthy. 2010. "Bacteriophage Lambda: A Paradigm Revisited." *Journal of Virology* 84 (13): 6876–79. doi:10.1128/JVI.02177-09.
- Gamage, Lakshman N a. 2010. "Assessment of the Immunogenicity of Porcine Circovirus 2 ( PCV2 ) Vaccines: A Prototype Vaccine and a Lambda Display Vaccine."
- Gamage, Lakshman N.A., John Ellis, and Sidney Hayes. 2009. "Immunogenicity of Bacteriophage Lambda Particles Displaying Porcine Circovirus 2 (PCV2) Capsid Protein Epitopes." *Vaccine* 27 (47): 6595–6604. doi:10.1016/j.vaccine.2009.08.019.
- Gao, Jianming, Yanlin Wang, Zhaoqi Liu, and Zhiqiang Wang. 2010. "Phage Display and Its Application in Vaccine Design." *Annals of Microbiology* 60 (1): 13–19. doi:10.1007/s13213-009-0014-7.
- Halstead, Scott B. 2014. "Dengue Antibody-Dependent Enhancement : Knowns and Unknowns," no. May 2018: 1–18. doi:10.1128/microbiolspec.AID-0022-2014.Correspondence.
- Haq, Irshad UL, Waqas Nasir Chaudhry, Maha Nadeem Akhtar, Saadia Andleeb, and Ishtiaq Qadri. 2012. "Bacteriophages and Their Implications on Future Biotechnology: A Review." *Virology Journal* 9 (1). BioMed Central Ltd: 9. doi:10.1186/1743-422X-9-9.
- Hayes, Sidney, Lakshman N.A. Gamage, and Connie Hayes. 2010. "Dual Expression System for Assembling Phage Lambda Display Particle (LDP) Vaccine to Porcine Circovirus 2 (PCV2)." *Vaccine* 28 (41). Elsevier Ltd: 6789–99. doi:10.1016/j.vaccine.2010.07.047.
- He, Junyun, Li Peng, Huafang Lai, Jonathan Hurtado, Jake Stahnke, and Qiang Chen. 2014. "A Plant-Produced Antigen Elicits Potent Immune Responses against West Nile Virus in Mice." *BioMed Research International* 2014. Hindawi Publishing Corporation. doi:10.1155/2014/952865.

- Jafari, Narjes, and Saeid Abediankenari. 2016. "Phage Particles as Vaccine Delivery Vehicles: Concepts, Applications and Prospects." *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 16 (18): 8019–29. doi:10.7314/APJCP.2015.16.18.8019.
- Jepson, Catherine D., and John B. March. 2004. "Bacteriophage Lambda Is a Highly Stable DNA Vaccine Delivery Vehicle." *Vaccine* 22 (19): 2413–19. doi:10.1016/j.vaccine.2003.11.065.
- Karch, Christopher P., and Peter Burkhard. 2016. "Vaccine Technologies: From Whole Organisms to Rationally Designed Protein Assemblies." *Biochemical Pharmacology* 120 (May): 1–14. doi:10.1016/j.bcp.2016.05.001.
- Katzelnick, Leah C., Lionel Gresh, M. Elizabeth Halloran, Juan Carlos Mercado, Guillermina Kuan, Aubree Gordon, Angel Balmaseda, and Eva Harris. 2017. "Antibody-Dependent Enhancement of Severe Dengue Disease in Humans." *Science* 358 (6365): 929–32. doi:10.1126/science.aan6836.
- Lander, Gabriel C, Alex Evilevitch, Meerim Jeembaeva, Clinton S Potter, and John E Johnson. 2009. "NIH Public Access" 16 (9): 1399–1406. doi:10.1016/j.str.2008.05.016.Bacteriophage.
- Lin, Hsiao Han, Bak Sau Yip, Li Min Huang, and Suh Chin Wu. 2018. "Zika Virus Structural Biology and Progress in Vaccine Development." *Biotechnology Advances* 36 (1). Elsevier Inc: 47–53. doi:10.1016/j.biotechadv.2017.09.004.
- López-Ortiz, Eduardo, and Santiago Montiel-Romero. 2017. "El Virus Zika En La Atención Primaria." *Atención Familiar* 24 (2). Universidad Nacional Autónoma de México: 49–50. doi:10.1016/j.af.2017.04.001.
- Mattiaccio, Jonelle, Scott Walter, Matt Brewer, William Domm, Alan E. Friedman, and Stephen Dewhurst. 2011. "Dense Display of HIV-1 Envelope Spikes on the Lambda Phage Scaffold Does Not Result in the Generation of Improved Antibody Responses to HIV-1 Env." *Vaccine* 29 (14): 2637–47. doi:10.1016/j.vaccine.2011.01.038.
- Mohan, Teena, Priyanka Verma, and D. Nageswara Rao. 2013. "Novel Adjuvants & Delivery Vehicles for Vaccines Development: A Road Ahead." *Indian Journal of Medical Research*.
- Naim, Hussein Y. 2013. "Applications and Challenges of Multivalent Recombinant Vaccines." *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 9 (3): 457–61. doi:10.4161/hv.23220.
- Nicastro, Jessica, Katlyn Sheldon, and Roderick A. Slavcev. 2014. "Bacteriophage Lambda Display Systems: Developments and Applications." *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (7): 2853–66. doi:10.1007/s00253-014-5521-1.
- Oyarzún, Patricio, and Bostjan Kobe. 2016. "Recombinant and Epitope-Based Vaccines on the Road to the Market and Implications for Vaccine Design and Production." *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 12 (3): 763–67. doi:10.1080/21645515.2015.1094595.
- Pande, Jyoti, Magdalena M. Szewczyk, and Ashok K. Grover. 2010. "Phage Display: Concept, Innovations, Applications and Future." *Biotechnology Advances* 28 (6). Elsevier Inc.: 849–58. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.07.004.
- Pierson, Theodore C., and Barney S. Graham. 2016. "Zika Virus: Immunity and Vaccine Development." *Cell* 167 (3). Elsevier Inc.: 625–31. doi:10.1016/j.cell.2016.09.020.

- Rodríguez-Morales, Alfonso J. 2015. "Zika: The New Arbovirus Threat for Latin America." *Journal of Infection in Developing Countries* 9 (6): 684–85. doi:10.3855/jidc.7230.
- Roldão, António, Maria Candida M Mellado, Leda R Castilho, Manuel JT Carrondo, and Paula M Alves. 2010. "Virus-like Particles in Vaccine Development." *Expert Review of Vaccines* 9 (10): 1149–76. doi:10.1586/erv.10.115.
- Rouvinski, Alexander, Wanwisa Dejnirattisai, Pablo Guardado-Calvo, Marie Christine Vaney, Arvind Sharma, Stéphane Duquerroy, Piyada Supasa, et al. 2017. "Covalently Linked Dengue Virus Envelope Glycoprotein Dimers Reduce Exposure of the Immunodominant Fusion Loop Epitope." *Nature Communications* 8 (May). doi:10.1038/ncomms15411.
- Saito, Yuka, Meng Ling Moi, Nozomi Takeshita, Chang Kweng Lim, Hajime Shiba, Kuniaki Hosono, Masayuki Saijo, Ichiro Kurane, and Tomohiko Takasaki. 2016. "Japanese Encephalitis Vaccine-Facilitated Dengue Virus Infection-Enhancement Antibody in Adults." *BMC Infectious Diseases* 16 (1). BMC Infectious Diseases. doi:10.1186/s12879-016-1873-8.
- Shan, Chao, Antonio E. Muruato, Bruno T.D. Nunes, Huanle Luo, Xuping Xie, Daniele B.A. Medeiros, Maki Wakamiya, et al. 2017. "A Live-Attenuated Zika Virus Vaccine Candidate Induces Sterilizing Immunity in Mouse Models." *Nature Medicine* 23 (6). Nature Publishing Group: 763–67. doi:10.1038/nm.4322.
- Tamez, Silvia, Catalina Eibenschutz, Xareni Zafra, and Raquel Ramírez. 2016. "La Articulación Público-Privada En La Producción de Vacunas En México." *Saúde Em Debate* 40 (111): 9–21. doi:10.1590/0103-1104201611101.
- Thomas, Brad S., Sandra Nishikawa, Kenichi Ito, Puja Chopra, Navneet Sharma, David H. Evans, D. Lorne J Tyrrell, Oliver F. Bathe, and Derrick E. Rancourt. 2012. "Peptide Vaccination Is Superior to Genetic Vaccination Using a Recombineered Bacteriophage  $\lambda$  Subunit Vaccine." *Vaccine* 30 (6). Elsevier Ltd: 998–1008. doi:10.1016/j.vaccine.2011.12.070.
- Troncoso, Alcides. 2016. "Zika Threatens to Become a Huge Worldwide Pandemic." *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6 (6). Elsevier B.V.: 520–27. doi:10.1016/j.apjtb.2016.04.004.
- Ulmer, Jeffrey B, Monique K Mansoura, and Andrew J Geall. 2015. "Vaccines 'on Demand': Science Fiction or a Future Reality." *Expert Opinion on Drug Discovery* 10 (2): 101–6. doi:10.1517/17460441.2015.996128.
- United Nations Development Program, and International Federation of the Red Cross and Red Crescent Societies. 2017. "A Socio-Economic Impact Assessment of the Zika Virus in Latin America and the Caribbean," 104.  
<http://www.undp.org/content/undp/en/home/librarypage/hiv-aids/a-socio-economic-impact-assessment-of-the-zika-virus-in-latin-am.html>.
- Vartak, Abhishek, and Steven Suchek. 2016. "Recent Advances in Subunit Vaccine Carriers." *Vaccines* 4 (2): 12. doi:10.3390/vaccines4020012.
- Yang, Fan, Patrik Forrer, Zbigniew Dauter, James F. Conway, Naiqian Cheng, Mario E. Cerritelli, Alasdair C. Steven, Andreas Plückthun, and Alexander Wlodawer. 2000. "Novel Fold and Capsid-Binding Properties of the  $\lambda$ -Phage Display Platform Protein GpD." *Nature Structural Biology* 7 (3): 230–37. doi:10.1038/73347.

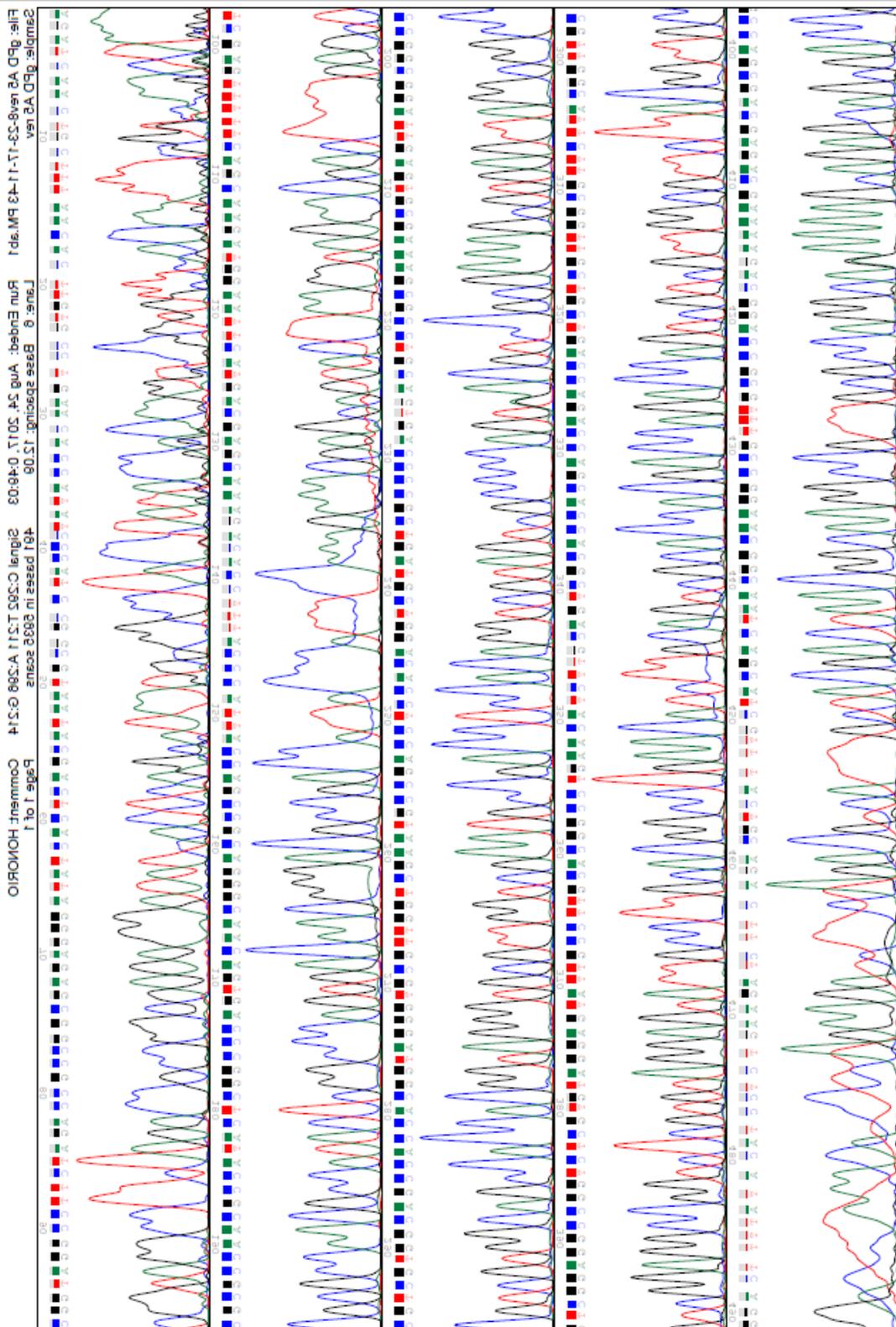
- Yang, Ming, Huafang Lai, Haiyan Sun, and Qiang Chen. 2017. "Virus-like Particles That Display Zika Virus Envelope Protein Domain III Induce Potent Neutralizing Immune Responses in Mice." *Scientific Reports* 7 (1). Springer US: 1–12. doi:10.1038/s41598-017-08247-9.
- Yusibov, Vidadi, Stephen J. Streatfield, and Natasha Kushnir. 2011. "Clinical Development of Plant-Produced Recombinant Pharmaceuticals: Vaccines, Antibodies and Beyond." *Human Vaccines* 7 (3): 313–21. doi:10.4161/hv.7.3.14207.
- Zhao, Haiyan, Estefania Fernandez, Kimberly A. Dowd, Scott D. Speer, Derek J. Platt, Matthew J. Gorman, Jennifer Govero, et al. 2016. "Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Protection." *Cell* 166 (4). Elsevier Inc.: 1016–27. doi:10.1016/j.cell.2016.07.020.

# Anexos



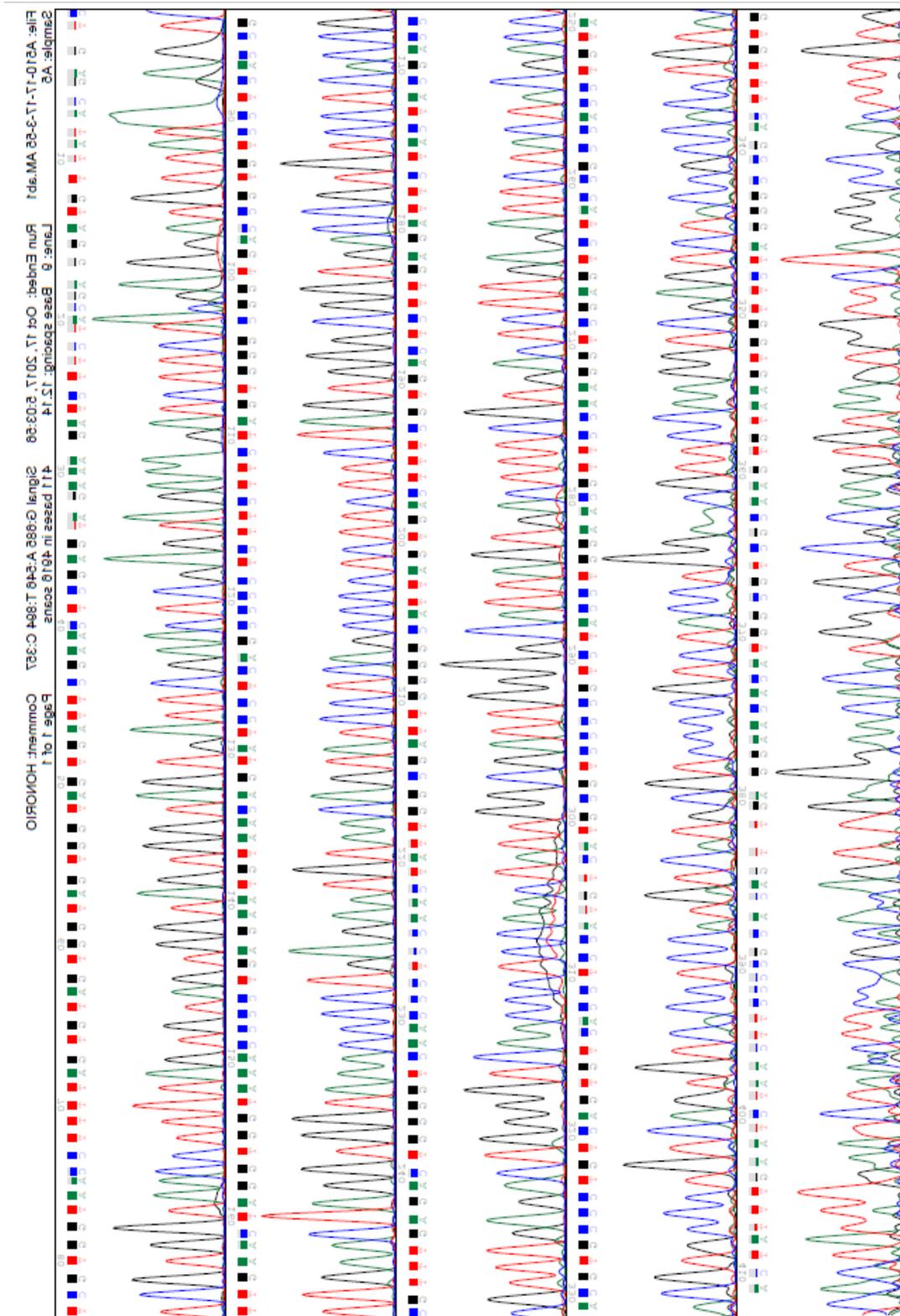
**Anexo 1: Análisis de frecuencia de uso de codones en *E. coli* para el fragmento EDIII.** Se muestra representado en barras la frecuencia de uso de codones del EDIII en *E. coli*. Aquellos con una frecuencia menor al 10% se muestran en barras rojas. De los 111 codones que corresponden a EDIII, 25 (22%) corresponden a codones “raros”. En flechas rojas se muestran aquellos codones “raros” que pueden ser suplementados por el vector pRARE.





Anexo 3: Electroferograma de la secuenciación de la candidata A5 de pJET-gpD.





Anexo 5: Electroferograma de la secuenciación de la candidata A5 de pJET-EDIII.

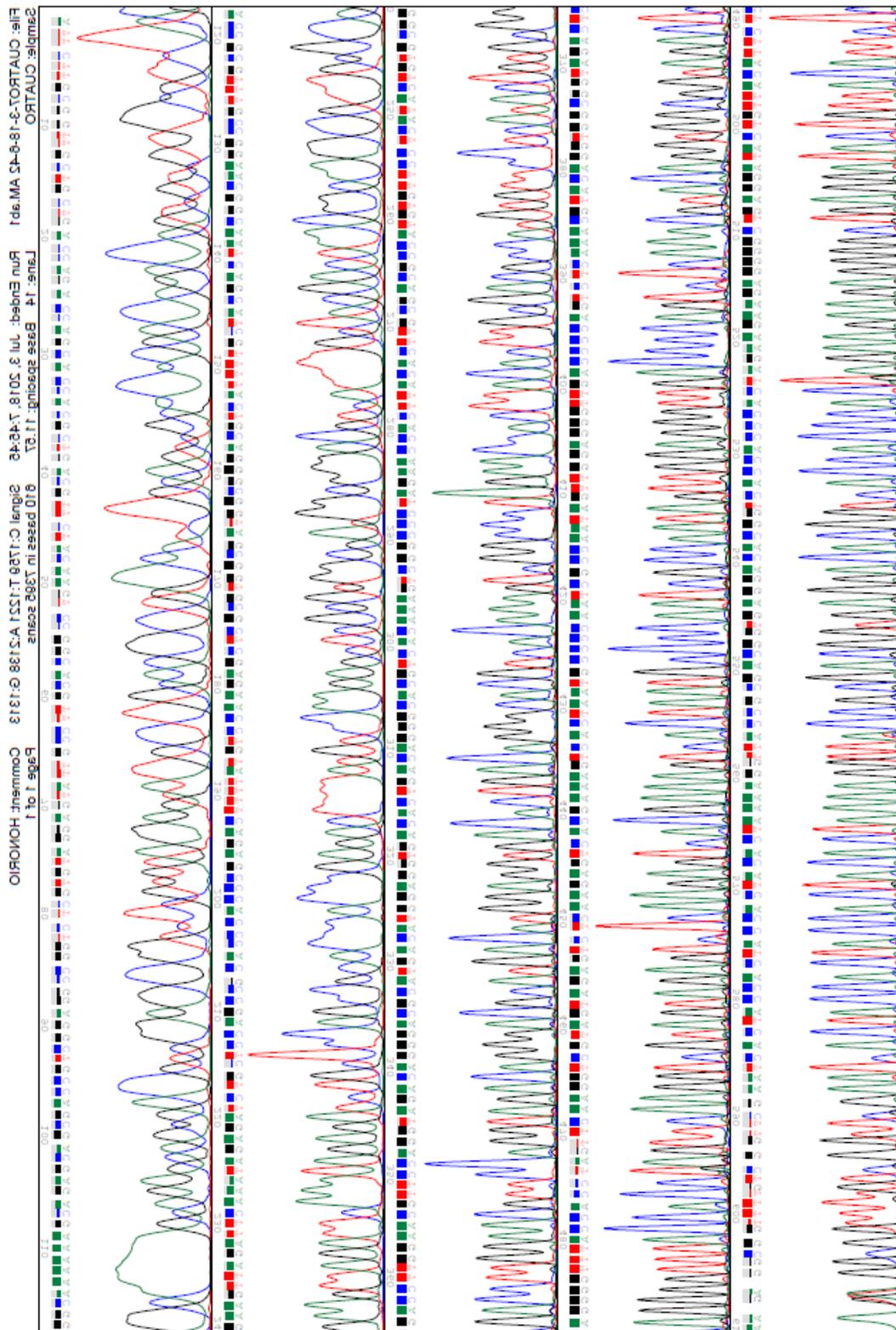












Anexo 11: Electroferograma de la secuenciación de la candidata A4 de pD-EDIII (Mod2).