



**“Establecimiento de las condiciones de cultivo para la expresión de la proteína E2 del subgenotipo 1b del BVDv en células CHO”**

Calderón Palacios, Josué Sebastián

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Dra. Ramos Gómez, Thelvia Isabel, PhD(c)

8 de marzo de 2023

5/3/23, 13:35

trabajo de titulación

## Informe de originalidad

---

**NOMBRE DEL CURSO**

Revisión de tesis

**NOMBRE DEL ALUMNO**

JOSUE SEBASTIAN CALDERON PALACIOS

**NOMBRE DEL ARCHIVO**

JOSUE SEBASTIAN CALDERON PALACIOS - Revisión de tesis

**SE HA CREADO EL INFORME**

5 mar 2023

---

**Resumen**

Fragmentos marcados	2	0,2 %
Fragmentos citados o entrecomillados	1	0,1 %

**Coincidencias de la Web**

passidireto.com	1	0,1 %
cienciasbiologicasudec.cl	1	0,1 %
scielo.org.bo	1	0,1 %

---

**THELVIA  
ISABEL  
RAMOS  
GOMEZ**

Firmado  
digitalmente por  
THELVIA ISABEL  
RAMOS GOMEZ  
Fecha: 2023.03.05  
17:31:35 -05'00'

**Dra. Ramos Gomez, Thelvia Isabel PhD(c)**

C. I. 1753960028



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**  
**Carrera de Biotecnología**

**Certificación**

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Establecimiento de las condiciones de cultivo para la expresión de la proteína E2 del subgenotipo 1b del BVDv en células CHO”** fue realizado por el señor **Calderón Palacios, Josué Sebastián**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 05 de marzo de 2023

THELVIA  
ISABEL RAMOS  
GOMEZ

Firmado digitalmente  
por THELVIA ISABEL  
RAMOS GOMEZ  
Fecha: 2023.03.05  
17:33:39 -05'00'

**Dra. Ramos Gomez, Thelvia Isabel PhD(c)**

C. C. 1753960028



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**  
**Carrera de Biotecnología**

**Responsabilidad de Autoría**

Yo, **Calderón Palacios, Josué Sebastián**, con cédula de ciudadanía n°1003944079, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Establecimiento de las condiciones de cultivo para la expresión de la proteína E2 del subgenotipo 1b del BVDv en células CHO”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 05 de marzo de 2023

.....  
**Calderón Palacios, Josué Sebastián**

C.C.: 1003944079



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Biotecnología**

**Autorización de Publicación**

Yo **Calderón Palacios, Josué Sebastián**, con cédula de ciudadanía n°1003944079, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **"Establecimiento de las condiciones de cultivo para la expresión de la proteína E2 del subgenotipo 1b del BVDv en células CHO"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

**Sangolquí, 5 de marzo de 2023**

Firma

**Calderón Palacios, Josué Sebastián**

C.C.: 1003944079

## **Dedicatoria**

Todo el esfuerzo y sacrificio puesto en este proyecto está dedicado a mis padres Guido y Lucía que son mi motor, mi inspiración y motivo para seguir adelante. A mis hermanos Mabe, Fabricio y Cae que me dieron un hogar y me hicieron la vida más sencilla cuando estuve lejos de casa. A mis sobrinos, Sebastián, Nicolás y Mathias, por quienes trato de ser una mejor persona día a día para convertirme en su ejemplo.

## Agradecimientos

Un profundo agradecimiento a la Dra. Raquel Montesino por su compromiso, dedicación y guía durante el desarrollo de este proyecto. El tiempo compartido fue sin duda, enriquecedor tanto para mi crecimiento académico como personal.

A mi tutora, la Dra. Thelvia Ramos por brindarme la oportunidad de conocer el mundo de la ciencia tal como lo imaginé desde las aulas y del que disfruté cada minuto con pasión.

A mi co-tutora Verónica Avello que con mucha paciencia compartió sus conocimientos conmigo de inicio a fin motivándome a trabajar con alegría, entusiasmo y responsabilidad.

A mi nueva familia en Chile, Nash, Nico y Tere que convirtieron el 2303 en el lugar donde las alegrías y triunfos eran más grandes, donde las penas terminaban y donde la palabra hogar cobraba sentido.

Al grandioso equipo de trabajo LBB que encontramos en Chile, por integrarnos, apoyarnos y siempre preocuparse por nosotros, en especial a Fernando, Santiago, Carla y Matheus.

A mis padres Guido y Lucía, que son la muestra más grande del amor y desde siempre me han apoyado en cada paso de mi vida. A mis hermanos Mabe, Fabricio y Cae que sin su ayuda no me hubiese convertido en la persona que soy ahora.

A mis amigas Mishell, María José y Estefanía, por su cariño y alegría durante mis días en la universidad. Me llevo muchos momentos que nunca voy a olvidar.

De corazón, muchas gracias por todo.

## Índice de Contenido

Hoja de resultados de la herramienta Google Assigments .....	2
Certificación .....	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos .....	7
Índice de Contenido .....	8
Índice de Tablas.....	11
Índice de Figuras .....	12
Abreviaturas.....	13
Resumen .....	15
Capítulo 1 .....	17
Introducción .....	17
Formulación del Problema.....	17
Justificación del Problema .....	19
Objetivos.....	23
<i>Objetivo general</i> .....	23
<i>Objetivos específicos</i> .....	23
Hipótesis .....	23
Capítulo 2 .....	24
Marco Referencial.....	24
Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDv) .....	24
Patología y Transmisión del BVDv .....	26
<i>Infección transitoria</i> .....	26
<i>Infección aguda</i> .....	27
<i>Infección persistente</i> .....	28
Mecanismo de infección viral .....	28
<i>Colonización del virus a la célula huésped</i> .....	29

Respuesta inmunitaria al BVDv .....	29
<i>Efectos inmunosupresores en animales infectados</i> .....	32
Diagnóstico.....	32
Control y medidas de prevención .....	33
Vacunas de subunidades.....	34
Plataformas de producción de proteínas recombinantes .....	35
Cultivo Celular CHO. Adherente y suspensión.....	37
Construcción y selección de clones que expresan la proteína E2 .....	38
Metodología .....	41
Preparación de medios y soluciones para cultivo celular .....	41
<i>Medio Completo</i> .....	41
<i>Medio Ex-Cell® ACF</i> .....	41
<i>Solución para criopreservación</i> .....	42
Cultivo en condiciones adherentes de células CHO subgenotipo 1b .....	42
<i>Descongelación de células CHO</i> .....	42
<i>Mantenimiento de células cultivo en adherencia</i> .....	42
<i>Criopreservación de células CHO</i> .....	43
<i>Eliminación del suero fetal bovino del medio y cosecha del sobrenadante</i> .....	43
Purificación de proteína E2.....	44
Cuantificación de proteínas .....	45
Precipitación de proteínas .....	46
Análisis de producción de proteína mediante geles desnaturalizantes.....	46
<i>Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE</i> .....	46
<i>Análisis mediante Western blot</i> .....	47
Producción de proteína E2 en cultivo celular adherente de células CHO 1b.....	47
Adaptación de células CHO 1b en condiciones adherentes a suspensión.....	48
Capítulo 4 .....	51
Resultados.....	51
Producción de proteína E2 de células CHO 1b cultivadas en adherencia.....	51
Adaptación de células CHO 1b a condiciones en suspensión.....	54
<i>Adaptación de células CHO 1b con reducción del 10% de medio completo</i> .....	54
<i>Adaptación de células CHO 1b con reducción del 20% de medio completo</i> .....	56

Análisis de la expresión de proteína E2 en cultivo en suspensión.....	58
Purificación de proteína E21b de células cultivadas en suspensión .....	60
Análisis de la proteína E21b purificada obtenida en suspensión .....	62
Capítulo 5 .....	66
Discusión .....	66
Capítulo 6 .....	71
Conclusiones .....	71
Capítulo 7 .....	73
Bibliografía.....	73

## Índice de Tablas

Tabla 1. <i>Efectos del BVDv en el sistema inmune innato y adaptativo</i> .....	31
Tabla 2. <i>Vacunas MLV comerciales para BVDv</i> .....	34
Tabla 3. <i>Diseño de adaptación de células CHO 1b a medio Ex-Cell con disminución del 10% de medio completo</i> .....	49
Tabla 4. <i>Diseño de adaptación de células CHO 1b a medio Ex-Cell con disminución del 20% de medio completo</i> .....	50
Tabla 5. <i>Adaptación de células CHO 1b a condiciones de crecimiento en suspensión con disminución de 10% de medio completo</i> .....	54
Tabla 6. <i>Adaptación de células CHO 1b a condiciones de crecimiento en suspensión con disminución de 20% de medio completo</i> .....	57
Tabla 7. <i>Producción de proteína E21b en todos los tratamientos</i> .....	63
Tabla 8. <i>Productividad específica de E21b en cada tratamiento</i> .....	65

## Índice de Figuras

Figura 1. <i>Estructura del BVDv</i> .....	24
Figura 2. <i>Representación esquemática de la unidad transcripcional para la expresión de las proteínas E2 de BVDv que contienen los subgenotipos 1a y 1c (ejemplo)</i> . ....	39
Figura 3. <i>Células CHO productoras de E21b en condiciones adherentes</i> .....	51
Figura 4. <i>Cromatograma de purificación de la proteína E2 1b producida en adherencia</i> .....	52
Figura 5. <i>Curva estándar de BSA para la cuantificación de proteína E21b mediante BCA</i> .....	52
Figura 6. <i>Análisis mediante SDS-PAGE y Western blot de la purificación de la proteína E21b producida en condiciones adherentes</i> .....	53
Figura 7. <i>Análisis de los parámetros de adaptación de las células CHO 1b con reducción del 10% de medio completo</i> .....	55
Figura 8. <i>Análisis de los parámetros de adaptación de las células CHO 1b con reducción del 20% de medio completo</i> .....	58
Figura 9. <i>Células CHO al finalizar la adaptación a suspensión</i> .....	59
Figura 10. <i>Análisis de proteína E2 presente en el sobrenadante de los cultivos en suspensión</i> .....	60
Figura 11. <i>Cromatograma de purificación de la proteína E21b producida en suspensión</i> .....	61
Figura 12. <i>Análisis de proteína E2 purificada del sobrenadante de los cultivos suspensión</i> .....	62
Figura 13. <i>Proteína E21b concentrada de todos los tratamientos</i> .....	63
Figura 14. <i>Comparación de productividad de E21b en cada condición de cultivo</i> .....	64

### Abreviaturas

BVDv	Virus de la diarrea viral bovina
cp	citopático
ncp	no citopático
PI	Animales persistentemente infectados
USD	dólar estadounidense
Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
IHC	inmunohistoquímica
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
VNT	Neutralización de virus
MDBK	Células de riñón bovino Madin-Darbey
kV	virus muerto
MLV	virus vivo atenuado
SFB	Suero fetal bovino
pvMD	Enfermedad de las mucosas posvacunal
DIVA	Diferenciación de animales infectados de vacunados
CHO	Células de ovario de hámster chino
Kb	Kilo bases
ARN	Ácido ribonucleico
ORF	Marco de lectura abierto
UTR	Región no traducida
kDa	Kilo dalton
HS	Síndrome hemorrágico
MD	Enfermedad de las mucosas
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino
Fc	Receptores específicos
G418	Antibiótico genética
pCI-neo	Vector de expresión de mamíferos

Tag	Secuencia blanco
pCMV	Promotor de citomegalovirus
Alb SP	Péptido señal de albúmina humana
T2A	Secuencia péptido autocatalítico T2A
poly A	Señal de poliadenilación
pSV40	Promotor de virus de simios 40
NeoR/KanR	Gen que confiere resistencia al antibiótico G418
RPMI-1640	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
DMSO	Dimetilsulfóxido
RPM	Revoluciones por minuto
CHO 1b	Células de ovario de hámster chino que expresan la proteína E2 subgenotipo 1b
EDTA	Ácido etilendiaminatetraacético
PBS	Buffer fosfato salino
CV	Volúmenes de columna
BCA	Ácido bicinconínico
TCA	Ácido tricloroacético
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
BSA	Albúmina de suero bovino
IMAC	Cromatografía de afinidad a iones metálicos
E21b	Proteína E2 del BVDv subgenotipo 1b

## Resumen

El virus de la diarrea viral bovina (BVDv) produce la enfermedad con el mismo nombre que es frecuente en la población bovina a nivel mundial y genera importantes pérdidas económicas para las industrias ganadera, láctea y cárnica. El BVDv causa infecciones permanentes que son de consideración debido a que los animales constituyen el principal reservorio de la enfermedad y son la fuente más importante de contagio. Los métodos actuales para el control de la enfermedad se basan en la vacunación y erradicación del ganado persistentemente infectado (PI). Sin embargo, la vacunación tradicional no permite diferenciar al ganado infectado del vacunado debido a la alta variabilidad antigénica del virus y los métodos de detección no permiten identificar al ganado PI debido a su baja prevalencia. Por ese motivo, las vacunas de subunidades de antígenos recombinantes, que combinan distintos subgenotipos virales, podrían ser una solución para el control del BVDv. En el presente trabajo se realizó la adaptación a condiciones de cultivo en suspensión de células de ovario de hámster chino (CHO) productoras de uno de los antígenos (E2) del BVDv subgenotipo 1b que formará parte de un candidato vacunal multivalente contra el BVDv. El diseño experimental consideró el incremento gradual por pasaje (10% y 20%), de medio libre de suero y la adición de suplementos iónicos de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ . Durante la adaptación la adición de suplementos no influyó positivamente en la densidad celular, viabilidad y tiempo de duplicación del cultivo. La expresión de la proteína E21b fue mayor con el incremento del 20% de medio libre de suero, obteniendo una productividad específica superior al cultivo con incremento del 10% por pasaje y al cultivo en condiciones adherentes. Las condiciones de cultivo establecidas en el presente trabajo podrán ser utilizadas en la obtención de los otros subgenotipos de BVDv.

*Palabras clave:* diarrea viral bovina, ganado persistentemente infectado, vacuna de subunidades, adaptación de cultivos celulares a suspensión, antígenos recombinantes

## Abstract

Bovine viral diarrhea virus (BVDv) causes the disease of the same name, which is frequent in the cattle population worldwide and generates important economic losses for the cattle, dairy and meat industries. BVDv causes permanent infections that are important because animals constitute the main reservoir of the disease and are the most important source of contagion. Current methods for disease control are based on vaccination and eradication of persistently infected (PI) cattle. However, traditional vaccination cannot differentiate infected from vaccinated cattle due to the high antigenic variability of the virus and detection methods cannot identify PI cattle due to their low prevalence. For that reason, recombinant antigen subunit vaccines, which combine different viral subgenotypes, could be a solution for BVDv control. In the present work, adaptation to suspension culture conditions of Chinese hamster ovary (CHO) cells producing one of the antigens (E2) of BVDv subgenotype 1b that will be part of a multivalent vaccine candidate against BVDv was performed. The experimental design considered the gradual increase by passage (10% and 20%), of serum-free medium and the addition of  $\text{Ca}^{+2}$  and  $\text{Mg}^{+2}$  ionic supplements. During adaptation, the addition of supplements did not positively influence cell density, viability and culture doubling time. E21b protein expression was higher with the 20% increase of serum-free medium, obtaining a specific productivity superior to the culture with 10% increase per passage and to the culture under adherent conditions. The culture conditions established in the present work could be used to obtain other BVDv subgenotypes.

*Keywords:* bovine viral diarrhea, persistently infected cattle, subunit vaccine, cell culture to suspension adaptation, recombinant antigens

## Capítulo 1

### Introducción

#### Formulación del Problema

El virus de la diarrea viral bovina (BVDv) pertenece al género *Pestivirus* dentro de la familia *Flaviviridae* (Wegelt et al., 2009) y es frecuente en la población bovina a nivel mundial. Este virus puede causar infecciones transitorias y permanentes dependiendo de la respuesta antiviral del huésped. La infección por este virus, en cualquiera de sus formas, causa pérdidas económicas significativas en las industrias ganadera, láctea y cárnica (Houe, 1999; Riley et al., 2019).

La diarrea viral bovina produce retraso del crecimiento, alta mortalidad, morbilidad, disminución en la producción de leche, sacrificio prematuro, aumento en la incidencia de otras enfermedades y provoca disfunciones reproductivas como aborto, infertilidad, crecimiento fetal lento, teratogénesis, reabsorción embrionaria, momificación y muerte fetal (da Silva Silveira et al., 2020; Khodakaram-Tafti & Farjanikish, 2017).

El BVDv presenta dos biotipos definidos según su capacidad para inducir apoptosis en células infectadas: de tipo citopáticos (cp) o no citopáticos (ncp) (Isken et al., 2019; Zhang et al., 2022). Este último es la causa de las infecciones agudas de la enfermedad y de la prevalencia de animales persistentemente infectados (PI) que son la fuente más importante de contagio (Lanyon et al., 2014). Los animales infectados con el biotipo ncp, preñados hasta de tres meses, pueden generar en su descendencia animales con malformaciones congénitas, fallas en la fertilización, retorno al celo, mortinatos, abortos o el nacimiento de terneros PI (Lanyon et al., 2014; Tautz et al., 2015). Estos terneros son inmunotolerantes y el reservorio principal de la enfermedad, por su capacidad de excretar el virus vivo en grandes cantidades a través de sus fluidos corporales (Houe, 1999; Khodakaram-Tafti & Farjanikish, 2017).

Resulta complejo calcular las pérdidas económicas producidas por un brote de BVDv dentro de un rebaño ya que depende de la inmunidad inicial del rebaño, el estado de preñez de las vacas en el momento del contagio y la virulencia de la cepa presente (Houe, 1999; Nugroho et al., 2022). La infección con cepas altamente virulentas, produce pérdidas económicas de aproximadamente \$40000 - \$100000 USD por rebaño y a nivel de población las pérdidas oscilan entre \$10 y \$40 millones USD por millón de partos (Houe, 1999, 2003). En programas de erradicación de la enfermedad realizados en Europa, se ha estimado un gasto anual de aproximadamente \$9 millones de USD durante los primeros tres años, donde los esfuerzos se centran en la erradicación del virus (Givens & Newcomer, 2015). Posteriormente, en los siguientes cuatro años, los gastos disminuyen a cerca de \$3.5 millones de USD anuales, tiempo que se dedica a la vigilancia y control con el objetivo de reducir la prevalencia del BVDv en los rebaños (Houe, 2003; Schweizer et al., 2021). Sin embargo, la rentabilidad de este tipo de programas aún se mantiene en duda por los altos costos de inversión y la utilidad de las medidas de control restringida a los rebaños en los que fue implementado (Houe, 2003; Lanyon et al., 2014).

## Justificación del Problema

Durante muchos años, el diagnóstico de la enfermedad permitió confirmar casos clínicos, sacrificar animales contagiados o mantener animales PI capaces de inducir una inmunización activa del rebaño (Houe, 1999). Además, se crearon planes para erradicar la enfermedad como la vacunación o el uso de medidas de bioseguridad (Houe, 2003). Posteriormente se implementaron diferentes estrategias para el control del BVDv: la estrategia no sistemática que incluía alguna medida de control y la sistemática que buscaba reducir la incidencia y prevalencia de las infecciones a largo plazo (Lindberg & Houe, 2005). En ambos casos se incluía o no la vacunación para el control del patógeno (Vargas et al., 2009).

En la actualidad los esfuerzos se han centrado en crear programas de control y erradicación del ganado PI, basadas en el uso eficiente de pruebas diagnósticas (Moennig & Becher, 2018). Las metodologías más utilizadas son: la detección de antígeno, la detección de anticuerpos y la detección del genoma viral (Lanyon et al., 2014; Vargas et al., 2009).

Según el tipo de resultado, se puede conocer la condición del animal, es decir, los animales que den negativo para anticuerpos (Ac), antígenos (Ag) y virus, son aquellos que nunca estuvieron expuestos al patógeno (Lanyon et al., 2014; Schweizer et al., 2021). Los animales inmunocompetentes que tienen una infección aguda dan positivo para Ac, generalmente también para Ag y negativo para virus (Spetter et al., 2021). Finalmente, los que tengan resultado positivo para Ag o virus, pero negativo para Ac, son los denominados PI (Khodakaram-Tafti & Farjanikish, 2017; Lysholm et al., 2019). Como los animales PI representan entre el 0,5 y 2% de la población bovina, no existen esquemas de muestreo que permitan detectar al animal PI sin analizar todo el rebaño (Peterhans et al., 2003a). Sin embargo, por el peligro de contagio que representan estos animales, debe establecerse un programa de vigilancia de los terneros nacidos durante nueve meses después de eliminar todos los animales PI presentes en el rebaño (Saliki & Dubovi, 2004).

Las metodologías para la detección de antígenos, anticuerpos o genoma viral comprenden distintas técnicas como: inmunohistoquímica (IHC), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de captura o indirecto, hibridación con sonda de ácido nucleico, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) y ensayos de neutralización de virus (VNT) (Saliki & Dubovi, 2004). Estas técnicas son capaces de diagnosticar la presencia del BVDv a partir de diferentes muestras (tejido, sangre, leche, secreciones nasales, fluidos fetales, orina, semen, entre otro (Almeida et al., 2019). Sin embargo, sus altos costos, tiempo de respuesta, probabilidad de obtener falsos positivos, y dificultad para identificar animales PI, disminuyen la confianza para una detección y control eficaz de la enfermedad en un rebaño (Houe et al., 2006; Lanyon et al., 2014).

Adicionalmente a las técnicas de diagnóstico mencionadas, las vacunas contra el BVDv han estado disponibles desde la década de 1960 demostrando su eficacia en el control de la enfermedad reduciendo la propagación de la infección en una población con presencia del virus, y disminuyendo los signos clínicos de los animales infectados (Ridpath, 2013). Actualmente en el mercado nacional e internacional están disponibles vacunas inactivadas o de virus muerto (Kv) y las de virus vivo atenuado (MLV, del inglés *modified-live virus*). Las vacunas Kv son las más seguras, pero requieren de refuerzo cada 6 meses para mantener los niveles de anticuerpos, mientras que las vacunas MLV generan anticuerpos que permanecen por mucho más tiempo (Vargas et al., 2009). A pesar de que las vacunas MLV ofrecen mayor protección y tiempo de inmunidad, las Kv son las más utilizadas debido a los problemas de seguridad informados por la vacunación con virus vivo atenuado durante la reproducción y la gestación (Walz et al., 2018).

Los problemas más comunes que presenta la vacunación basada en la tecnología convencional son: el desarrollo de la enfermedad de las mucosas posvacunal (pvMD), inmunosupresión generada por vacunas MLV, contaminación debido al proceso de fabricación de las vacunas que utilizan suero fetal bovino (SFB) con presencia de BVDv, reversión de la

virulencia, baja eficacia debido a la alta variabilidad antigénica del BVDv e imposibilidad de usar una estrategia DIVA (del inglés, differentiating the infected from the vaccinated animals) para la diferenciación de animales infectados de los vacunados (Laureyns et al., 2010; Ridpath, 2013).

Las limitaciones antes mencionadas pudieran superarse mediante el desarrollo de vacunas de subunidades que pueden inducir una respuesta inmune ante una gran variedad de BVDv circulantes en la población. Además, proveen mayor seguridad en términos de transmisión horizontal y vertical (Bellido et al., 2021). La proteína E2, perteneciente a la cápside del virus, es el candidato más adecuado para el desarrollo de este nuevo tipo de vacunas debido a su alta capacidad inmunogénica y a la inducción de altos títulos de anticuerpos neutralizantes (Pecora et al., 2015; Thomas et al., 2009). Además, estas vacunas permiten diferenciar al ganado vacunado del infectado de forma natural (Thomas et al., 2009).

El desarrollo de vacunas de subunidades implica la producción de proteínas inmunogénicas a través de vectores de expresión que puedan ser introducidos a células que actúen como fábricas productivas (Francis, 2018). Este es el caso de las células de mamíferos, en específico de las células de ovario de hámster chino (CHO) que han sido ampliamente usadas en la producción de biofarmacéuticos (Arthuso et al., 2012; Jukić et al., 2016). Las características que hacen que esta plataforma sea utilizada para la producción de proteínas recombinantes son: huéspedes seguros, alta productividad, producen modificaciones postraduccionales necesarias para el plegamiento correcto de las proteínas (J. Y. Kim et al., 2012), se adaptan a medios químicamente definidos o libres de suero (Rosini & Pollegioni, 2022) y permite cultivos a gran escala (Tihanyi & Nyitray, 2020). En su mayoría, estas células crecen de forma adherente con requerimientos de suero animal, lo que aumenta el riesgo de introducción de virus u otros agentes transmisibles, por lo que establecer una línea celular capaz de proliferar en un cultivo en suspensión es uno de los pasos principales en la producción de biofármacos (Walther et al., 2016). El desarrollo de vacunas de subunidades implica la producción de proteínas inmunogénicas a través de vectores de expresión que

puedan ser introducidos a células que actúen como fábricas productivas (Francis, 2018). Este es el caso de las células de mamíferos, en específico de las células de ovario de hámster chino (CHO) que han sido ampliamente usadas en la producción de biofarmacéuticos (Arthuso et al., 2012; Jukić et al., 2016). Las características que hacen que esta plataforma sea utilizada para la producción de proteínas recombinantes son: huéspedes seguros, alta productividad, producen modificaciones postraduccionales necesarias para el plegamiento correcto de las proteínas (J. Y. Kim et al., 2012), se adaptan a medios químicamente definidos o libres de suero (Rosini & Pollegioni, 2022) y permite cultivos a gran escala (Tihanyi & Nyitray, 2020). En su mayoría, estas células crecen de forma adherente con requerimientos de suero animal, lo que aumenta el riesgo de introducción de virus u otros agentes transmisibles, por lo que establecer una línea celular capaz de proliferar en un cultivo en suspensión es uno de los pasos principales en la producción de biofármacos (Walther et al., 2016).

El presente estudio busca establecer las condiciones de cultivo en suspensión de células CHO transfectadas para la expresión de la proteína E2 del subgenotipo 1b del BVDv. El antígeno E2 luego de purificado será utilizado para el desarrollo de un prototipo de vacuna multivalente contra Diarrea Viral Bovina.

## **Objetivos**

### ***Objetivo general***

Establecer las condiciones de cultivo en suspensión para la expresión de la proteína E2 del subgenotipo 1b del BVDv en células CHO.

### ***Objetivos específicos***

- Obtener la proteína E2 de células CHO en condiciones de cultivo adherente a partir del clon productor previamente seleccionado
- Adaptar las células CHO del clon productor de proteína E2, del subgenotipo 1b a condiciones de cultivo en suspensión
- Determinar la productividad de expresión de proteína E2 en cada sistema de cultivo de células CHO: adherente vs suspensión.

## **Hipótesis**

El rendimiento de producción de la proteína E2 obtenida de células CHO en condiciones de cultivo en suspensión es mayor en relación a la obtenida en condiciones adherentes.

## Capítulo 2

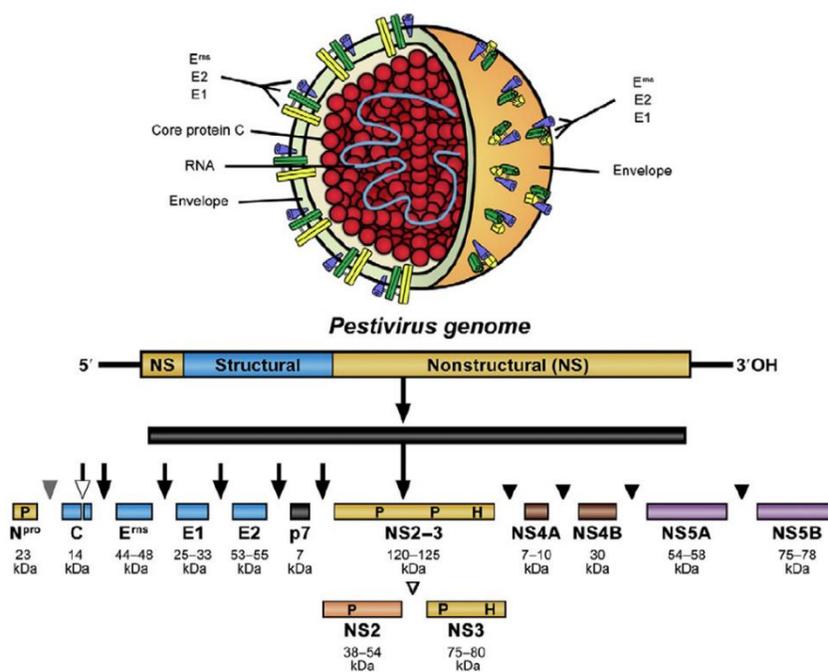
### Marco Referencial

#### Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDv)

El virus de la diarrea viral bovina (BVDv) es un ARN monocatenario con polaridad positiva y tamaño de 12,3 kb aproximadamente (Wegelt et al., 2009; Yeşilbağ et al., 2017). Posee un único marco de lectura abierto (ORF) que está flanqueado por regiones no traducidas (UTR) que son importantes para su replicación (Darweesh et al., 2018; Kuca et al., 2020). El ORF codifica una sola poliproteína que se escinde en doce proteínas maduras; cuatro estructurales: la proteína C perteneciente a la cápside, las proteínas E<sup>ms</sup>, E1 y E2 que forman parte de la envoltura y ocho no estructurales: N<sup>pro</sup>, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B (Figura 1) (Al-Kubati et al., 2021; Radtke & Tews, 2017; Yeşilbağ et al., 2017).

#### Figura 1

##### Estructura del BVDv



*Nota:* Imagen adaptada de (Tautz et al., 2015)

Las proteínas más destacadas a nivel inmunogénico de BVDv son las glicoproteínas E<sup>ms</sup>E1, E2 y la no estructural NS3 (Koethe et al., 2020; Riedel et al., 2020). La proteína E2 es una glicoproteína que interviene en la entrada del virus a la célula huésped, por tanto, se ha utilizado como candidato vacunal por su capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes (Radtke & Tews, 2017; Wegelt et al., 2009). La E2 tiene un peso de aproximadamente 53–55 kDa, forma homodímeros y heterodímeros con E1, lo que determina el tropismo de las especies (Koethe et al., 2020; Radtke & Tews, 2017).

La proteína E2 consta de cuatro epítomos en sus tres dominios: dos en el dominio I (90 aminoácidos) y dos en el dominio II (78 aminoácidos) (Jelsma et al., 2013). El dominio III (175 aminoácidos) no contiene epítomos, pero es la parte más conservada de la proteína (Li et al., 2013). Sin embargo, estudios recientes incluyen sitios antigénicos en el dominio III, lo que sugiere la exposición de toda la estructura de E2 a la superficie del virus, contribuyendo a la respuesta inmunitaria contra el virus (Al-Kubati et al., 2021). La inmunogenicidad generada por la E2 se ha documentado a través de la medición de anticuerpos en animales infectados con el virus (Koethe et al., 2020; Yeşilbağ et al., 2017).

El BVDv se clasifica genéticamente en dos especies, BVDv-1 perteneciente a los Pestivirus A, con 21 subtipos (a-u) y BVDv-2 que pertenece a los Pestivirus B, con 4 subtipos (a-d) (da Silva Silveira et al., 2020; Oğuzoğlu et al., 2019; Smith et al., 2017). Adicionalmente a las mencionadas, se considera una nueva especie tipo HoBi, Pestivirus H o BVDv-3, con similitudes genéticas y antigénicas al BVDv (Al-Kubati et al., 2021; Bauermann et al., 2013).

## **Patología y Transmisión del BVDv**

La infección con BVDv puede provocar desde síntomas subclínicos leves hasta trastornos crónicos. Inicialmente las cepas de BVDv-2 se consideraban más virulentas que las BVDv-1, porque los casos graves de la enfermedad se observaban con mayor frecuencia (Tautz et al., 2015). Sin embargo, existen casos donde su infección puede ser inaparente o presentar síntomas leves (Khodakaram-Tafti & Farjanikish, 2017).

Existen dos tipos de transmisión: la vertical que ocurre desde uno de los padres hacia su descendencia y la horizontal que sucede entre animales por contacto directo (Schweizer et al., 2021). La transmisión vertical más importante es la que genera animales PI a partir de hembras preñadas infectadas, sin embargo, otras formas son: el semen (Nugroho et al., 2022), la transferencia de embriones (Bielanski et al., 2009) y la infección por vacunas MLV contaminadas (Falcone et al., 1999). Por otro lado, el contagio horizontal se produce debido a fómites (alimento, agua, equipo contaminado), palpaciones, hacinamiento (contacto nasal), secreciones-excreciones (orina, heces, leche, moco, sangre), aerosoles de virus y vectores (moscas, tábanos) (Khodakaram-Tafti & Farjanikish, 2017). Además, el biotipo no citopático (ncp) produce las infecciones agudas de la enfermedad y la fuente más importante de contagio, que es el ganado persistentemente infectado (PI) (Lanyon et al., 2014).

### ***Infección transitoria***

Existen varios factores que determinan la gravedad de la viremia producida por una infección que en la mayoría de los casos se da por BVDv ncp (Peddireddi et al., 2018). Entre los más destacados están: la virulencia y el genotipo del virus, la edad, el estado inmunológico y fisiológico del huésped, el estado de preñez si es el caso y la presencia de otros patógenos (Khodakaram-Tafti & Farjanikish, 2017).

En su forma leve, que sucede en el 70-90% de los casos con animales inmunocompetentes, no gestantes y seronegativos, produce síntomas como leucopenia

transitoria, letargo, diarrea, anorexia, fiebre leve, erosiones orales leves, aumento de la secreción nasal, tos, úlceras, entre otros signos (Khodakaram-Tafti & Farjanikish, 2017; Lanyon et al., 2014). El virus tiene un período de incubación de 5 a 7 días y los síntomas pueden persistir hasta 15 días (Tautz et al., 2015).

### ***Infección aguda***

Las cepas de BVDv-2 altamente virulentas que producen una infección primaria son las causantes de infecciones agudas graves que se caracterizan por: trombocitopenias severas acompañadas de fiebre, diarrea, neumonía, epistaxis, hemorragias oculares y subcutáneas que producen alta mortalidad (Khodakaram-Tafti & Farjanikish, 2017; Y. Liu et al., 2021).

Luego de una infección aguda, el virus se ubica en los enterocitos, placas de Peyer, timo, ganglios linfáticos del bazo, amígdalas e hígado (Lanyon et al., 2014). Después del sexto día de infección, el virus comienza a expulsarse desde el huésped y es posible identificar apoptosis de linfocitos mediada por células T, que resulta en la eliminación del virus entre nueve y trece días después de la infección (Liebler-Tenorio et al., 2004).

Además, el BVDv puede producir, en el ganado, síndrome hemorrágico (HS) y el síndrome de la enfermedad de las mucosas (MD), que es una enfermedad esporádica que afecta a los animales de 6 a 24 meses de edad (Khodakaram-Tafti & Farjanikish, 2017). Este síndrome causa diarrea sanguinolenta acompañada de fiebre, anorexia, ataxia y debilitamiento en general. La mortalidad es del 100% y se produce luego de aproximadamente 2 semanas del inicio de los signos clínicos. La causa principal de la muerte es una deshidratación asociada a la reabsorción alterada de agua debido a la destrucción de la mucosa intestinal, específicamente del tejido linfoide asociado al intestino (GALT) (Tautz et al., 2015).

### ***Infección persistente***

Los animales contagiados por el virus durante los días 25 y 90 de la gestación aproximadamente, generan una infección persistente (Lanyon et al., 2014; Vargas et al., 2009). El biotipo ncp de BVDv es capaz de inhibir la inducción del interferón I, lo que permite que el feto reconozca al virus como propio y no se genere una respuesta inmune (Peterhans et al., 2003b; Schweizer et al., 2021).

Lo más peligroso de una infección con BVDv es la inmunosupresión de los animales infectados que aumenta el riesgo de una superinfección con otros virus y bacterias (Ma et al., 2022). En estos animales prevalecen enfermedades como: la mastitis, bronconeumonía, diarrea (Laureyns et al., 2010) y afecciones del tracto respiratorio causadas por virus transitorios como el virus sincitial respiratorio, de parainfluenza y herpes bovino (Peterhans et al., 2003b). Además, está demostrado que la MD sólo se desarrolla en animales PI con BVDv después de transmisión diaplacentaria durante el primer trimestre de gestación, lo que provoca inmunotolerancia al virus persistente. Esta persistencia es característica de los pestivirus (Tautz et al., 2015).

### **Mecanismo de infección viral**

El BVDv es capaz de ingresar por la nariz o boca hacia la mucosa orofaríngea mediante ingestión o inhalación (Tautz et al., 2015). La replicación del virus empieza luego del contacto en las células epiteliales de las amígdalas palatinas. Los virus ensamblados salen de las células por exocitosis y se transportan por el torrente sanguíneo. La forma en que se disemina por el organismo es a través de virus libre en el suero y leucocitos infectados (Khodakaram-Tafti & Farjanikish, 2017) que llegan hacia varios tejidos sucede en cuestión de días y se asocia al origen inmunitario (Tautz et al., 2015).

La propagación de virus envueltos como el BVDv ocurre mediante dos mecanismos: en el primero, luego de liberarse de las células, el virus se difunde a través del espacio extracelular y en el segundo se mantienen asociado a las células infectadas y se difunde por contacto célula-célula de manera rápida y eficiente (Merwaiss et al., 2019).

### ***Colonización del virus a la célula huésped***

El virión de BVDv interactúa con el receptor específico CD46 de la célula huésped y ocurre la fusión de la envoltura del virus con la membrana celular (Lanyon et al., 2014). Posterior al ingreso, el ARN viral es liberado al citoplasma donde empieza la traducción mediante la unión del sitio IRES y la subunidad 40S del ribosoma (C. Liu et al., 2019). Una vez formado el complejo 80S en el codón de inicio, comienza la traducción de la poliproteína que posteriormente es escindida en proteínas estructurales y no estructurales (Ma et al., 2022). La replicación ocurre en un complejo de replicasa positivo en el extremo 3' compuesto por partes virales y celulares seguido del alargamiento por una polimerasa viral (C. Liu et al., 2019). A continuación, la proteína de la cápside C se une al ARN viral e identifica la región del citoplasma que contiene la proteína de la envoltura encontrada en la cavidad del retículo endoplasmático (Ma et al., 2022). Los viriones maduran en vesículas intracelulares en el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático y aquellos que están intactos son expulsados por exocitosis ocho horas después de la infección (C. Liu et al., 2019).

### **Respuesta inmunitaria al BVDv**

El primer efecto en el sistema inmunitario innato de los animales infectados por el BVDv es el reconocimiento del peligro mediante la presentación de antígenos y señales coestimuladoras (Chase et al., 2004). El BVDv influye en las vías proinflamatorias que reclutan a los linfocitos circulantes y aumentan la hematopoyesis de linfocitos en la médula ósea (Chase, 2013). Además, afecta la función de neutrófilos, monocitos, macrófagos y células dendríticas (Glew et al., 2003). Muchos pasos del sistema inmune innato como la producción de

interferón, fagocitosis, quimiotaxis y destrucción micobicida se ven afectados (Chase, 2013; Peterhans et al., 2003b). Esta interacción produce distintos efectos y cambios en el sistema inmune innato dependiendo del tipo de célula afectada (Chase et al., 2004) (Tabla 1).

Por otro lado, la infección por BVDv en el sistema inmune adaptativo afecta las múltiples vías de las células T y B debido a la apoptosis causada en tejidos linfoides. Este efecto depende de la cepa y el biotipo de BVDv (Chase, 2013). La célula T auxiliar CD4+ es el objetivo principal del BVDv y se ve afectada según el biotipo del virus que determina la señalización y dinámica de reconocer una célula T auxiliar 1 (Th-1) o T auxiliar 2 (Th-2) (Chase et al., 2004).

La disminución de la regulación de MHC II e IL-2 tiene un efecto negativo en las respuestas de las células T auxiliares (Abdelsalam et al., 2020). El BVDv ncp activa las respuestas de células Th-2 que afecta a la inmunidad adquirida e innata. Además, la IL-4 e IL-10 producidas suprimen la respuesta de Th-1, la actividad fagocítica y microbicida de los macrófagos (Tabla 1) (Chase et al., 2004).

La respuesta inmune protectora es específica del genotipo con cierta protección cruzada entre ellos (Hamers et al., 2000, 2002). Las células T citotóxicas CD8+ y los anticuerpos son fundamentales para la protección contra la infección. Además, la tercera clase de células T  $\gamma/\delta$ -T tienen un papel importante contra el desarrollo de enfermedad de las mucosas en animales PI (Chase, 2013).

**Tabla 1***Efectos del BVDv en el sistema inmune innato y adaptativo*

	<b>Cambios celulares y/o de citoquinas</b>	<b>Efecto sobre el sistema inmune</b>	<b>Efecto sobre la respuesta a la enfermedad del animal</b>
Sistema inmune innato	↓ Quimiotaxis	↓ Migración de neutrófilos	↑ 2° Infección microbiana
	↓ Fc, CD14 y expresión del receptor del complemento	↓ Fagocitosis	↑ 2° Infección microbiana
	↓ Fagocitosis	↓ Ingestión de microorganismos	↑ 2° Infección microbiana
	↓ TNF- $\alpha$	↓ Producción de citocinas inflamatorias	↓ Respuesta inmune innata y adaptativa
	↑ Inhibidores de IL-1	↓ Producción de citocinas inflamatorias y células T	↓ Respuesta inmune innata y adaptativa
	↓ Producción de superóxido	↑ Crecimiento microbiano	↑ 2° Infección microbiana
	↓ Actividad microbicida		
	↓ Producción de IFN-ncp de BVDv	↓ Respuesta antiviral	Evasión inmune e infección viral
	↑ Producción de IFN-cp de BVDv	↑ Respuesta antiviral	Apoptosis y muerte de la célula infectada
Sistema inmune adaptativo	↓ Expresión de MHC II	↓ Presentación de antígenos	↓ Respuesta inmune innata y adaptativa
	↓ Expresión por ncp de MHC I	↓ Eliminación de CTL	↑ Evasión inmune e infección viral
	↑ Activación por cp de T auxiliares 1	↑ Respuesta de CTL	↑ Respuesta protectora a largo plazo
		↑ Células T de memoria	
	↑ Activación por ncp de T auxiliares 2	↑ Activación de células B	↑ Producción de anticuerpos
			↓ Respuesta CMI

*Nota.* ↑, aumento; ↓, disminución; 2°, secundaria; CD14, receptor de lipopolisacárido; cp, BVDv citopático; Fc, fragmento de región constante de inmunoglobulina; IFN, interferón alfa; IL-1, interleucina 1; ncp, BVDv no citopático; TNF- $\alpha$ , factor de necrosis tumoral alfa; CMI, respuesta

mediada por células; CTL, linfocito T citotóxico; MHC, complejo mayor de histocompatibilidad.

Tabla adaptada de (Chase et al., 2004)

### ***Efectos inmunosupresores en animales infectados***

Los animales infectados por BVDv cursan con inmunosupresión asociada a cambios en las células del huésped (Tautz et al., 2015). Los cambios más significativos observados son la disminución de linfocitos, inmunoglobulinas, quimiotaxis, disminución de la actividad microbicida y de migración de neutrófilos (Chase et al., 2004). Además, se observa en los animales infectados disminución de la expresión de receptores del complemento, receptores específicos (Fc) y de la producción de quimiocinas (Peterhans et al., 2003b). La inhibición de actividades metabólicas básicas y el aumento de la prostaglandina E2 también están presentes (Chase et al., 2004).

### **Diagnóstico**

El diagnóstico del BVDv se realiza mediante la detección de antígeno, la detección de anticuerpos y la detección del genoma viral (Lanyon et al., 2014). Los antígenos pueden ser detectados mediante aislamiento viral y crecimiento en líneas celulares, por técnicas de inmunohistoquímica (IHC) en tejidos, por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de captura, por hibridación con sonda de ácido nucleico o por la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) (Saliki & Dubovi, 2004).

La mejor técnica para el diagnóstico de BVDv es el aislamiento viral, pero representa un alto costo ya que requiere de espacio para cultivo celular y varios días para obtener un resultado (Saliki & Dubovi, 2004). Por ello, la técnica de RT-PCR está siendo ampliamente utilizada para la detección de antígeno debido a que es menos costosa, sensible y se puede realizar a partir de una variedad de fluidos corporales (sangre, leche, secreciones nasales, orina, semen, saliva, fluidos fetales) con cantidades potencialmente bajas de virus (Houe et al.,

2006). Sin embargo, presenta inconvenientes al diferenciar los animales con infecciones agudas de los PI, a partir de muestras de leche a granel (Lanyon et al., 2014).

Por otro lado, la técnica ELISA, a pesar de ser simple, rápida, económica con alta especificidad y sensibilidad (Houe et al., 2006), puede presentar reactividad cruzada con el virus de la enfermedad de la frontera y disminuir su sensibilidad por los anticuerpos del calostro de terneros lactantes. De manera similar sucede con la IHC que está restringida a las muestras de tejido, siendo una técnica más invasiva para el animal y el resultado se basa en un sistema subjetivo de puntuación (Lanyon et al., 2014).

La detección de anticuerpos específicos del virus también es una opción para determinar el estado inmunitario de un animal. Sin embargo, no es suficiente para identificar individuos PI, ya que solo demuestra una exposición previa al BVDv (Lanyon et al., 2014). Para su detección se utilizan ensayos inmunoenzimáticos (ELISA-indirecto) y de neutralización de virus (VNT). Este último busca evaluar la presencia o ausencia de efectos citopáticos inducido por el virus en células MDBK (Almeida et al., 2019; Houe et al., 2006). La ventaja que presenta el ELISA indirecto es que no requiere de la producción del virus, sin embargo, con títulos bajos del virus y almacenamiento prolongado de los sueros, las muestras positivas pueden dar un falso negativo mediante este método (Lanyon et al., 2014).

### **Control y medidas de prevención**

Para el control y prevención de la enfermedad, las vacunas surgieron con dos objetivos: el primero era prevenir el desarrollo de una enfermedad clínica posterior a la exposición a BVDv y el segundo consistía en prevenir la infección fetal que produce los animales PI (Falkenberg et al., 2021; Ridpath, 2013). En términos generales, la vacunación no es capaz de prevenir todas las infecciones generadas por BVDv, sin embargo, se considera eficaz al reducir el número total de infecciones y favorecer la inmunidad de rebaño (Moennig & Becher, 2018).

Las vacunas pueden ser de dos tipos: inactivadas o de virus muerto (Kv) y las de virus vivo atenuado (MLV). Las vacunas Kv son las más utilizadas por ser consideradas las más

seguras a pesar que se ha comprobado que las vacunas MLV ofrecen mayor protección y tiempo de inmunidad (Vargas et al., 2009; Walz et al., 2018).

Las vacunas MLV en su mayoría son multivalentes, combinadas con otros antígenos virales (Moennig & Becher, 2018) como IBR (Rinotraqueitis Bovina Infecciosa), PI-3 (Parainfluenza Bovina), BRSV (Virus Sincitial Respiratorio Bovino), virus de la peste porcina clásica (CSFV) o antígenos bacterianos como *Pasteurella spp*, *Moraxella spp*, entre otros (Tabla 2) (Fulton et al., 2020; Vargas et al., 2009).

**Tabla 2**

*Vacunas MLV comerciales para BVDv*

<b>Vacuna</b>	<b>Tipo de vacuna</b>	<b>Compañía</b>	<b>País</b>
Pyramid ® / Presponse ®	Multivalente: Contra BVDv - 1/2, IBR, BRSV, PI3 y <i>M. haemolytica</i>	Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH	Alemania
INFORCE ®	Multivalente: Contra BVDv - 1/2 y <i>M. haemolytica</i> tipo A1	Zoetis Belgium SA	Bélgica
MLV Bovela ®	Bivalente BVDv – 1/2	Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH	Alemania
Suvaxyn CSF Marker ®	Monovalente basada en BVDv - 1b y la proteína E2 del CSFV	Zoetis Belgium SA	Bélgica
Bovela ®	Atenuada de BVDv – 1b y BVDv – 2a	Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH	Alemania

*Nota.* Tabla adaptada de (Koethe et al., 2020)

### **Vacunas de subunidades**

Las vacunas de subunidades de proteínas recombinantes tienen una composición bien definida con al menos un tipo de antígeno viral que se puede producir en sistemas de expresión heterólogos (Wang et al., 2016). El antígeno seleccionado debe garantizar que la respuesta inmunitaria se limite a ese componente y no sea posible su réplica en la célula huésped (Ugochukwu et al., 2020).

La producción del antígeno ocurre mediante un proceso en el que se identifica la proteína inmunogénica particular del patógeno. Una vez identificado el gen, se clona y se expresa en un sistema que favorezca las características nativas de la proteína. La especificidad confiere a este tipo de vacunas mayor seguridad que las vacunas vivas atenuadas (MLV) y las de virus muerto (Kv), además, permite diferenciar al ganado vacunado del infectado, lo que ha ganado espacio en los últimos años (Wang et al., 2016). Además, las vacunas de subunidades pueden contener más de una proteína antigénica, lo que amplía la protección contra varios subgenotipos del virus (Montesino et al., 2019).

### **Plataformas de producción de proteínas recombinantes**

La tecnología de proteínas recombinantes permite una producción rentable debido a que se ha vuelto eficiente, disponible y económicamente accesible (Pollet et al., 2021). Un paso clave para la producción exitosa de proteínas recombinantes funcionales es la elección de la plataforma o sistema de expresión (Gecchele et al., 2015). Las características del huésped, el entorno bioquímico, los costos asociados, la productividad, la capacidad de traducción de ARN, la seguridad, la eficacia y la estabilidad del producto son algunos de los aspectos evaluados en la selección de la plataforma de producción de proteínas recombinantes (Swiech et al., 2015). Las células de plantas, insectos, levadura, bacterias y organismos superiores se han utilizado mostrando ventajas y desventajas (Mizukami et al., 2018).

Las bacterias se utilizan para producir proteínas no glicosiladas debido a la falta de maquinaria enzimática que no les permite realizar modificaciones postraduccionales (Swiech et al., 2015). Por otro lado, las levaduras son capaces de glicosilar proteínas, pero los N-glicanos añadidos tienen más de cien residuos de manosa que afectan a la vida media de la proteína luego de administrarse, lo que genera reacciones inmunitarias inesperadas (Ghaderi et al., 2012; Tripathi & Shrivastava, 2019). Las células vegetales también pueden producir glicoproteínas aún más similares estructuralmente, sin reactivos derivados de animales, pero su rendimiento es inferior frente a los sistemas de células de mamíferos (Feng et al., 2022). Las

células de insectos en combinación con el vector de expresión de baculovirus son capaces de realizar la mayoría de modificaciones postraduccionales similares a los mamíferos, excepto la sialilación que es fundamental para la actividad biológica y vida media de la proteína (Khan et al., 2017; Mizukami et al., 2018).

Una de las modificaciones postraduccionales necesarias para que una proteína viral sea utilizada como candidato vacunal es la adición de cadenas oligosacarídicas a los sitios potenciales de N-glicosilación (Tejwani et al., 2018). La modificación ocurre en los compartimentos retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, e involucra a más de cien genes y proteínas (Mizukami et al., 2018). Esta maquinaria celular es característica de la célula eucariota y específicamente la de mamífero (en levadura funciona diferente). Estos eventos no están reportados para células procariontes, lo que limita el uso de esta plataforma para la producción de proteínas recombinantes (Tripathi & Shrivastava, 2019).

Existen dos tipos de glicosilaciones de proteínas O y N. Esta última hace referencia a la adición de glicanos al átomo de nitrógeno de la asparagina en la cadena de polipeptídica que forma parte del tripéptido Asn/X/Ser o Asn/X/Thr donde X puede ser cualquier amino ácido excepto Prolina (Mizukami et al., 2018; Tejwani et al., 2018). La presencia de estos glicanos unidos a N cumplen un papel fundamental en la inmunogenicidad, la eficacia, la bioactividad, la farmacocinética y farmacodinámica del producto (Mizukami et al., 2018).

El sistema de expresión en células de mamíferos presenta una diferencia extra en la producción de proteínas recombinantes, ya que este tipo de células es capaz de secretar naturalmente las proteínas de interés al medio de cultivo, lo que facilita su purificación (Pereira et al., 2018; Swiech et al., 2015).

La proteína E2 del BVDv ha sido producida en células de insecto utilizando vectores de basados en baculovirus (Thomas et al., 2009). Este sistema es capaz de expresar un alto nivel de proteínas heterólogas y puede realizar modificaciones postraduccionales de manera similar a las células de mamífero (Mizukami et al., 2018). Sin embargo, en la ruta de glicosilación de

proteínas de insectos, los N-glicanos producidos son más simples y contienen Fuca1,3 enlazada a la GlcNAc más interna, que no está presente en proteínas producidas en células de mamífero, por tanto, este motivo glicosídico pudiera resultar inmunogénico (Thomas et al., 2009). Esta diferencia resulta fundamental al tratarse de una proteína de la superficie de virus envueltos, como el BVDv, ya que la N-glicosilación es un factor determinante en la función biológica, plegamiento, estabilidad y antigenicidad de la E2 (Tejwani et al., 2018).

### **Cultivo Celular CHO. Adherente y suspensión**

La línea celular de células de mamífero más utilizada y exitosa para la producción de proteínas recombinantes es la de ovario de hámster chino (CHO) (J. Y. Kim et al., 2012). Esta ha sido catalogada por diferentes autores como resistente, confiable, estable y de alta productividad (Bandaranayake & Almo, 2014; Rodrigues et al., 2013; Rosini & Pollegioni, 2022).

Estas características de las células CHO se deben a que están equipadas con una maquinaria capaz de realizar un procesamiento postraduccional adecuado y además, facilitar los procesos de purificación aguas abajo por la secreción de proteínas al medio (Rodrigues et al., 2013; Rosini & Pollegioni, 2022). Las células CHO más utilizadas son CHO-K1, CHO DXB11, CHO-S y CHO DG44 y se ha demostrado que pueden alcanzar una productividad de entre 0,1 a 1 g/L en cultivos en lotes y entre 1 a 10 g/L en cultivos alimentados (Tihanyi & Nyitray, 2020).

De manera general, las líneas celulares de CHO son cultivadas en condiciones adherentes, sin embargo, este tipo de cultivo está limitado por el área de la superficie de crecimiento, requiere pasajes periódicos, disociación enzimática y uso de suero fetal bovino (SFB) para su mantención, lo que representa un bajo rendimiento del producto y altos costos (ThermoFisher, s.f.). Además, el uso de SFB, al ser una mezcla mal definida de componentes, genera inconvenientes en la purificación por su alto contenido de proteínas; también puede retrasar el crecimiento celular por la presencia de hormonas y puede ser una fuente de

contaminación con agentes microbianos como bacterias, hongos, virus y micoplasma capaces de transmitir enfermedades al huésped final del producto (Rodrigues et al., 2013).

Las células CHO son capaces de superar estas limitantes ya que tienen una adaptabilidad sin igual a medios libres de SFB lo que reduce el riesgo de contaminación viral y priónica (Bandaranayake & Almo, 2014). Además, en el cultivo en suspensión los pasajes y el monitoreo es más sencillo, no requiere de disociación enzimática o mecánica y el crecimiento se limita a la concentración de células en el medio, lo que permite un escalado fácil (ThermoFisher, s.f.).

Todas las características mencionadas del cultivo en suspensión cumplen con las demandas del mercado y los objetivos de la industria biofarmacéutica que busca reducir los costos y aumentar el rendimiento productivo con células capaces de crecer en biorreactores con densidades celulares predecibles y fiables (J. Y. Kim et al., 2012; Rodrigues et al., 2013).

La adaptación de la línea celular CHO es un proceso rutinario en la producción de proteínas recombinantes para la industria biofarmacéutica. Sin embargo, en la etapa previa a la adaptación se da la selección de clones que muestren las propiedades fenotípicas y de expresión necesarias. La calidad y uniformidad del producto, el tiempo de duplicación y la viabilidad celular son características que se evalúan durante este proceso (Bandaranayake & Almo, 2014).

### **Construcción y selección de clones que expresan la proteína E2**

El laboratorio de Biotecnología y Biofármacos de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad de Concepción (UdeC) trabaja en el proyecto IDeA I+D 2021 denominado “Prototipo de vacuna multivalente contra Diarrea Viral Bovina” y en cumplimiento con su primer objetivo de identificar los subgenotipos del BVDv prevalentes en zonas ganaderas representativas del país, realizó la tipificación de las cepas virales a partir de muestras de sueros de animales PI. La identificación determinó que el subgenotipo 1b del BVDv es el que mayor prevalencia tiene en las zonas ganaderas representativas del país (Chile), confirmando

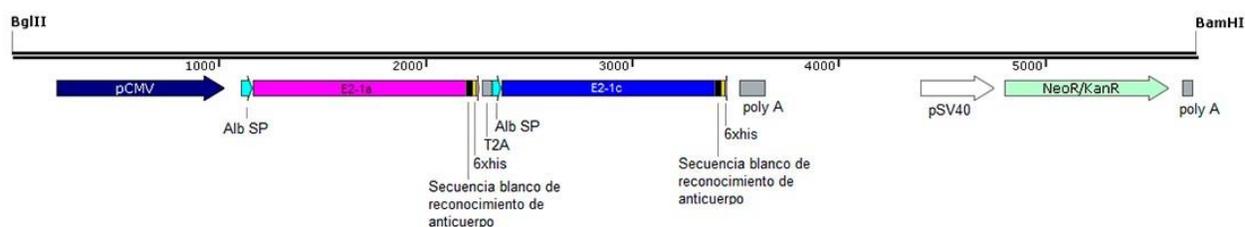
lo presentado por estudios previos, donde se determinó al subgenotipo 1b como el predominante en América, Asia y Europa (Yeşilbağ et al., 2017).

El desarrollo del prototipo vacunal incluyó el diseño y construcción de los vectores plasmídicos codificantes para las proteínas E2 de los subgenotipos del BVDv. A cada secuencia E2 se le insertó, en el C-terminal, una secuencia blanco (tag) para el reconocimiento por anticuerpos específicos que permite detectar la expresión y purificación de todas las variantes de E2 (Strep-tag, C-myc-tag, HA-tag, Flag-tag y E-tag). Además, se insertó un tag de histidina para facilitar la purificación por cromatografía de afinidad a iones metálicos.

Las construcciones fueron insertadas en el vector de expresión de mamíferos pCI-neo. Los plásmidos contienen el promotor de citomegalovirus (pCMV) y el gen de expresión de la enzima neomicina fosfotransferasa II (EC 2.7.1.95), que confiere resistencia al antibiótico G418, lo que permite la selección de las células que integren y expresen los genes de interés (Figura 1). Los plásmidos obtenidos fueron introducidos en la bacteria *Escherichia coli*, cepa top10, donde se amplificaron y purificaron.

## Figura 2

Representación esquemática de la unidad transcripcional para la expresión de las proteínas E2 de BVDv que contienen los subgenotipos 1a y 1c (ejemplo).



Nota: pCMV: promotor de citomegalovirus. Alb SP: péptido señal de albúmina humana. E2-1a y E2-1c: secuencias codificantes para las proteínas E2 de los subgenotipos 1a y 1c, respectivamente. 6xHis: Cola de histidina. T2A: Secuencia péptido autocatalítico T2A. poly A:

Señal de poliadenilación. pSV40: promotor de virus de simios 40. NeoR/KanR: Gen que confiere resistencia al antibiótico G418.

Posteriormente, las células de la cepa CHO-K1 (ATCC®CCL-61), se transfectaron con el cassette transcripcional utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen, USA). Las células que presentaron mayor fluorescencia fueron seleccionadas por citometría de flujo, y cultivadas en medio RPMI con 10% suero bovino fetal (SFB). Para evaluar los clones con mayor expresión de la proteína E2 subgenotipo 1b, se realizó un análisis de inmunodetección en el cual la mayor producción de la proteína presentaba una mayor fluorescencia.

## Capítulo 3

### Metodología

El proceso para establecer las condiciones de cultivo en suspensión de las células CHO requiere de tres etapas según los objetivos planteados. En la primera etapa se realizó el cultivo en condiciones adherentes del clon previamente seleccionado y la posterior cosecha del sobrenadante, donde se encontraba la proteína E2 de interés que se purificó y cuantificó. En la segunda etapa se desarrolló la adaptación gradual de las células desde las condiciones adherentes hasta el crecimiento en medio libre de suero animal. Por último, en la tercera etapa se cosechó la proteína E2 contenida en el sobrenadante del cultivo en suspensión y se purificó para realizar la comparación de expresión en ambos sistemas de cultivos.

### Preparación de medios y soluciones para cultivo celular

#### ***Medio Completo***

El medio RPMI-1640 (Gibco, EE. UU) se preparó según lo indicado por la ficha técnica de la casa comercial disolviendo el contenido en 900  $\mu$ L de agua destilada a una temperatura entre 15-20°C. Posteriormente se agregó el antibiótico – antimicótico (Anti-Anti) (Gibco, EE. UU) a concentración final de 0,25  $\mu$ g/mL de anfotericina B, 100 U/mL de penicilina y estreptomicina; L-glutamina (Gibco, EE. UU) 2mM; 2 g/L de bicarbonato de sodio y se ajustó el pH entre 7-7,3. Se filtró en condiciones estériles con ayuda de una bomba peristáltica utilizando un filtro de 0,22 micras (Merck, EE. UU). Finalmente, se dispensó en tubos falcon de 50 mL a los que se agregó suero fetal bovino (SFB) al 10% (Sigma, EE. UU). Las alícuotas de medio completo se almacenaron a 4°C.

#### ***Medio Ex-Cell® ACF***

El medio Ex-Cell® ACF (Merck, EE. UU) se preparó según la [ficha técnica](#) de la casa comercial. El medio se disolvió (21,5 g) en 900  $\mu$ L de agua destilada a una temperatura entre

25-30°C. A esta mezcla se le adicionó el antibiótico – antimicótico (Anti-Anti) (Gibco, EE. UU) a concentración final de 0,25 µg/mL de anfotericina B, 100 U/mL de penicilina y estreptomina; L-glutamina 4 mM y 1,5 g/L de bicarbonato de sodio. Se ajustó el pH a 7.3-7.5 con NaOH 5 M. Se filtró en condiciones estériles con ayuda de una bomba peristáltica y un filtro de 0,22 micras. Se almacenó en un frasco estéril de vidrio de 1 L a 4°C.

### ***Solución para criopreservación***

La solución de criopreservación formulada según lo publicado por Rodrigues et al., (2013) contiene 10% de suero fetal bovino (SFB), 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, EE. UU) y 80% de medio RPMI-1640. En el caso de congelación de células adaptadas a medio libre de suero, la composición de la solución de criopreservación es de 90% medio Ex-Cell® ACF y 10% de DMSO.

### **Cultivo en condiciones adherentes de células CHO subgenotipo 1b**

#### ***Descongelación de células CHO***

La descongelación de las células CHO del clon preseleccionado pertenecientes al subgenotipo 1b de BVDv se realizó en baño termostataado, a 37°C con agitación manual leve. Las células fueron pasadas a un tubo falcon de 15 mL con 2 mL de medio completo. El tubo fue centrifugado a 800 revoluciones por minuto (RPM) por 8 minutos. El sobrenadante fue eliminado y el precipitado fue resuspendido con 2 mL de medio completo. Se adicionaron las células a un frasco T25 (Falcon, EE. UU) y se agregó medio completo hasta un volumen final de 5 mL.

#### ***Mantenimiento de células cultivo en adherencia***

La línea celular de ovario de hámster chino que expresa de forma recombinante la proteína E2 del subgenotipo viral 1b (CHO 1b) se obtuvo mediante la transfección de la línea celular CHO-K1 (ATCC®CCL-61) en el Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción, Chile.

La mantención de CHO 1b, se realizó en frascos T25 donde primero se comprobó la confluencia observando el frasco con un microscopio invertido (Olympus BH-2, Japón). En cámara de flujo laminar vertical (Telstar AV-100, Japón), se eliminó el sobrenadante del frasco con pipetas pasteur y se lavaron las células adheridas con 2 mL de buffer fosfato salino (PBS: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM) estéril. Se adicionaron 400 µL de tripsina-EDTA 0,25% (Sigma, EE. UU) y se llevó a una incubadora de atmósfera controlada (ThermoFisher, EE. UU) por 5 minutos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. La reacción se detuvo adicionando 1 mL de medio completo, se homogeneizó de manera manual y se desechó 1 mL de células. Posteriormente se adicionó 5 mL de medio completo y antibiótico geneticina (G418) a 800 µg/mL (Corning, EE. UU). La incubación del frasco T25 se dio a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas.

### ***Criopreservación de células CHO***

Las células que se encontraban confluentes en un frasco T25 fueron llevadas a congelación adaptando lo publicado por Rodrigues et al., (2013). El sobrenadante fue eliminado, las células se lavaron con 2 mL de PBS y se disociaron con 400 µL de tripsina-EDTA 0,25%. La neutralización de la tripsina fue realizada con 1 mL de medio completo. Todo el volumen fue traspasado a un tubo falcon de 15 mL. El tubo fue centrifugado a 800 RPM por 8 minutos. El sobrenadante fue descartado y el precipitado resuspendido en un volumen tal que la concentración de células sea de  $5 \times 10^5$  células/mL. Los crioviales fueron congelados utilizando el sistema Mr Frosty (Sigma, EE. UU) o en su defecto, llevados a congelación de -20 °C por 1 hora, para posteriormente ser pasados a -80°C, proporcionando una velocidad de congelación de aproximadamente -1°C/min.

### ***Eliminación del suero fetal bovino del medio y cosecha del sobrenadante***

El sobrenadante del medio de cultivo se eliminó del frasco T25 con pipeta pasteur y bomba peristáltica. Las células se lavaron con PBS y se agregaron 7 mL de medio RPMI sin

SFB y G418 a 200 µg/mL. Se llevó a incubación a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Pasado este tiempo los 7 mL de sobrenadante se colectaron, en tubos falcon de 15 mL, se centrifugó a 1000 RPM por 20 minutos. El sobrenadante se guardó en congelación a -20 °C hasta su análisis. El mismo proceso se realizó para placas de cultivo de 150 mm.

### **Purificación de proteína E2**

La purificación de la proteína E2 se realizó adaptando el protocolo publicado por Sánchez et al., (2008) mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC). Previo a la purificación los conectores del equipo de cromatografía AKTA prime plus (GE Healthcare, Suecia) se limpiaron utilizando agua destilada y etanol 20%. Posteriormente, se conectó la columna que contiene la matriz de Sefarosa High Performance (GE Healthcare, Suecia). Teniendo en cuenta que la matriz se conserva en etanol al 20% se pasaron 2 volúmenes de columna (CV) de agua destilada y seguidamente se cargó con solución de sulfato de níquel (Sigma, EE. UU) 100 mM (1 CV). Posteriormente se eliminó el exceso de níquel pasando agua destilada (2 CV) y finalmente se equilibró con 5 CV de buffer de equilibrio (Tris HCl 500mM, NaCl 300mM y 5mM Imidazol). Esta etapa de adecuación y equilibrio de la matriz se realizó a un flujo de 2 mL/min.

Al sobrenadante de cultivo que contenía la proteína de interés se le adicionó un volumen de una solución más concentrada de Tris HCl/NaCl/Imidazol para que la muestra inicial esté a la misma concentración del buffer de equilibrio. La muestra se pasó una vez por la matriz níquel-efarosa a 2 mL/min. El volumen que pasó a través de la columna se colectó en un frasco limpio y se recirculó toda la noche con el mismo flujo. Con esto se garantizó mejorar la adherencia de las proteínas en la matriz.

Una vez unida la proteína a la matriz, se pasó buffer de equilibrio hasta observar el descenso de la señal UV en el cromatograma. Con el fin de eliminar uniones inespecíficas o más débiles a la matriz se realizaron dos pasos de lavado, con imidazol 25 mM y 40 mM en el

mismo buffer de equilibrio. La elución de la E2 se realizó con Imidazol 400 mM. Las fracciones obtenidas en los lavados y la elución se colectaron para su análisis en gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS- PAGE) y Western blot.

Una vez recuperada toda la proteína purificada se circuló por la columna NaCl-0,5M + EDTA-0,2M para eliminar el níquel unido a la matriz, hasta observar el cambio de color en la misma. Finalmente, para lavar la matriz se circularon 2 CV de agua con un flujo de 5 mL/min, seguidos de 2 CV con el mismo flujo de etanol al 20%. La columna fue desconectada y el equipo fue limpiado con 2 programas de lavado consecutivos de agua y etanol al 20%.

La proteína eluida fue dializada en buffer fosfato salino (PBS) toda la noche para eliminar el imidazol contenido en la muestra. Posteriormente fue concentrada mediante concentrador vivaspin con cut off de peso molecular de 10000 kDa (GE Healthcare, Suecia) centrifugando a 5000 RPM por 20 minutos y 15°C. Finalmente la proteína fue almacenada a -20°C para su posterior análisis.

### **Cuantificación de proteínas**

La cuantificación de la proteína se realizó mediante el método del ácido bicinconínico (BCA), utilizando una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) (ThermoFisher, EE. UU) con concentraciones entre 0.25 y 2 mg/mL. La solución de reactivos se realizó en relación 1:50 de Reactivo A: Reactivo B considerando 200 µL de mezcla por pocillo.

En una placa de 96 pocillos, se agregaron 5 µL de la muestra a analizar en cada pocillo y 200 µL de mezcla de Reactivo A: Reactivo B preparada a una relación de 50:1. Se homogenizó y se incubó a 37°C por 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se leyó el color generado por la reacción, en el espectrofotómetro lector de placas (Agilent, EE. UU) a una longitud de onda de 562 nm.

## **Precipitación de proteínas**

El análisis de la proteína en el medio de cultivo mediante SDS-PAGE se realizó posterior a la concentración de estas basado en el protocolo de Arnold & Ulbrich-Hofmann, (1999) por el método del Ácido Tricloro Acético – Deoxicolato de Sodio. Para esto se agregó 1/10 de volumen de la muestra de deoxicolato de sodio (1,5 mg/mL), se agitó vigorosamente por 1 minuto en vórtex y se dejó reposando por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió 1/10 de volumen de muestra de ácido tricloroacético (TCA) al 76% y se agitó vigorosamente en vórtex. La mezcla se centrifugó a 12000 RPM por 15 minutos en microcentrífuga y se desechó el sobrenadante. El precipitado se lavó con acetona fría y se agitó fuertemente por 1 minuto en vórtex. Se centrifugó nuevamente a 12000 RPM por 5 minutos y se desechó el sobrenadante. El precipitado que contiene las proteínas se resuspendió en 30  $\mu$ L de PBS.

## **Análisis de producción de proteína mediante geles desnaturalizantes**

### ***Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE***

La producción de la proteína se analizó mediante electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12,5% y 1,5 mm de espesor según lo recomendado por Laemmli, (1970). La corrida se realizó a voltaje constante de 100 V durante 2 horas. A las muestras se les añadió buffer de carga (SDS 400 mM, azul de bromofenol 0,1 mM, glicerol 47%, Tris-HCl 60 mM, pH 6.8,  $\beta$  mercaptoetanol 30%) en relación 5:1 (muestra:buffer) y se calentaron a 95 °C por 5 minutos antes de ser cargadas en el gel. Las bandas de proteína se visualizaron tiñendo el gel con solución de tinción (2,5 g/L de azul brillante Coomassie R-250, 45% de metanol y 10% de ácido acético glacial) por 1 hora y se destiñó con solución de destinción (20% de metanol, 10% de ácido acético glacial) por toda la noche. El gel se escaneó utilizando el equipo Odyssey (LICOR EE. UU).

### **Análisis mediante Western blot**

Luego de la separación de las proteínas en el gel de poliacrilamida, según lo sugerido por Laemmli, (1970) se transfirió a una membrana de nitrocelulosa BA-85 (Schleicher & Schuell, Alemania) mediante un equipo de transferencia semi-húmeda (BioRad, EE. UU) a 0,3 A, 25 V durante 30 minutos. La membrana se bloqueó con leche descremada al 5% en PBS por 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Luego, se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-histidina de ratón (ClonTech, EE. UU) diluido 1:10.000 en leche descremada al 1% en PBS y 0,005% de Tween20 durante toda la noche a 4°C y agitación constante. A continuación, se lavó tres veces con solución de lavado (PBS, Tween20 0,1%, SDS 0,01%) por 10 minutos cada uno. Posteriormente, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado a Alexa Fluor® 790 (Jackson ImmunoResearch, EE. UU) diluido 1:30.000 en leche descremada al 1%, PBS y 0,005% Tween20, durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación y en oscuridad. Finalmente, luego de 3 nuevos lavados de 10 minutos cada uno se escaneó la membrana con el equipo Odyssey (LI-COR, EE. UU).

### **Producción de proteína E2 en cultivo celular adherente de células CHO 1b**

Las células CHO 1b, obtenidas a partir de la selección de clones con mejores características de expresión de proteína E2, fueron seleccionadas para la adaptación a medio libre de suero. Estas células, se cultivaron siguiendo el protocolo publicado por (Rodrigues et al., 2013) en condiciones adherentes en placas de cultivo de 150 mm de diámetro con medio RPMI + 10% de SFB y el antibiótico G418 a una concentración de 800 µg/mL, en un volumen final de 25 mL durante 48 horas.

Posteriormente se cambió a medio RPMI sin suero y se añadió antibiótico G418 a 200 µg/mL. En estas condiciones, las placas se cultivaron por 72 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. El sobrenadante de cultivo colectado (900 mL) se centrifugó a 10000 RPM por 20 minutos para eliminar cualquier residuo celular y se almacenó a -20°C.

### **Adaptación de células CHO 1b en condiciones adherentes a suspensión**

La adaptación de las células CHO 1b del clon previamente seleccionado se realizó de manera gradual, en base a lo publicado por Wu et al., (2021) mediante la reducción progresiva del 10% de medio completo (tratamiento lento) que contenía suero fetal bovino (SFB) y el aumento del medio Ex-Cell® ACF libre de suero (Tabla 3). La adaptación fue realizada en dos condiciones: suplementada y suplementada con sales de Ca<sup>+2</sup> y Mg<sup>+2</sup>, por duplicado. La concentración utilizada para el suplemento de la segunda condición fue de 2,54 mM de CaCl<sub>2</sub> y 1,42 mM de MgCl<sub>2</sub>. La reducción del 10% de medio completo se dio siempre y cuando se cumplan tres condiciones de adaptación: i) densidad mayor a 6x10<sup>5</sup> células/mL; ii) viabilidad superior al 90% y iii) tiempo de duplicación menor a 50 horas. En caso de no cumplirse alguna de las tres condiciones propuestas, el pasaje se mantiene por 48 o 72 horas más, en la misma concentración manteniendo la densidad celular inicial que fue determinada en 6x10<sup>4</sup> células/mL.

Las células adheridas cultivadas en frascos T25 hasta el pasaje 5 fueron lavadas con PBS, disociadas con tripsina-EDTA 0,25% y recuperadas en un tubo de 15 mL. Se tomó una alícuota de 50 µL que se diluyó en relación 1:1 con azul de tripán para ser contabilizadas mediante cámara Neubauer (Marca, País). Se realizó el conteo manual de cuatro recuadros del campo, con exclusión de dos bordes en cada uno de ellos. La densidad celular se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$DC = \frac{\#Células}{\#recuadros} \times 10.000 \times \text{factor de dilución}$$

Las células se centrifugaron a 800 RPM por 8 minutos y el sobrenadante fue eliminado con pipetas de plástico. Las células se resuspendieron en medio completo a una concentración final de 1000 células/mL. Se sembraron los cultivos con una densidad celular inicial de 6x10<sup>4</sup> células/mL y se agregó el antibiótico G418 a una concentración de 1200 µg/mL. El cultivo se

incubó por 48 horas a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5% desde el pasaje 0 hasta el pasaje 4, mientras que desde el pasaje 5 hasta el 10 se cultivaron por 72 horas debido a la reducción del crecimiento.

**Tabla 3**

*Diseño de adaptación de células CHO 1b a medio Ex-Cell con disminución del 10% de medio completo*

N° Pasaje	Medio Completo: Medio Ex-Cell	Tiempo de cultivo (h)	Volumen Medio Completo (mL)	Volumen Medio Ex-Cell (mL)
0	100:0	48	5	0
1	90:10	48	4,5	0,5
2	80:20	48	4	1
3	70:30	48	3,5	1,5
4	60:40	48	3	2
5	50:50	72	2,5	2,5
6	40:60	72	2	3
7	30:70	72	1,5	3,5
8	20:80	72	1	4
9	10:90	72	0,5	4,5
10	0:100	72	0	5

Además, se realizó la adaptación de las células a condiciones de suspensión incrementando el medio libre de suero en 20% (tratamiento rápido) por pasaje (Tabla 4).

La suplementación del medio de cultivo libre de suero (Ex-Cell) con sales de CaCl<sub>2</sub> y MgCl<sub>2</sub> puede producir precipitación en el medio de cultivo ya que las sales de calcio en particular son propensas a reaccionar con MgSO<sub>4</sub> y formar cristales de CaSO<sub>4</sub>. Teniendo en cuenta lo anterior, los suplementos se agregaron directamente en los frascos de cultivo y no en las alícuotas de medio dispensadas.

**Tabla 4**

*Diseño de adaptación de células CHO 1b a medio Ex-Cell con disminución del 20% de medio completo*

<b>N° Pasaje</b>	<b>Medio Completo: Medio Ex-Cell</b>	<b>Tiempo de cultivo (h)</b>	<b>Volumen Medio Completo (mL)</b>	<b>Volumen Medio Ex-Cell (mL)</b>
0	100:0	48	5	0
1	80:20	48	4	1
2	60:40	48	3	2
3	40:60	48	2	3
4	20:80	48	1	4
5	0:100	48	0	5

El escalado de las células totalmente adaptadas al medio libre de suero Ex-Cell® ACF ocurrió 48 horas después del pasaje 10 en el tratamiento lento y del pasaje 5 en el tratamiento rápido desde los frascos T25 con volumen total de 5 mL hacia frascos T75 con un volumen final de 20 mL. Las células suspendidas en el sobrenadante fueron colectadas en tubos falcon de 15 mL, centrifugadas por 8 minutos a 800 RPM y resuspendidas en medio Ex-Cell® ACF nuevo para eliminar los contaminantes del medio. Las células se cultivaron por 48 horas con antibiótico G418 a una concentración de 1200 µg/mL a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Posteriormente las células se llevaron a frascos de vidrio estériles de 250 mL con un volumen efectivo de 125 mL de medio Ex-Cell® ACF realizando el mismo procedimiento mencionado. Las células adaptadas fueron cultivadas con agitación de 120 RPM en las mismas condiciones ambientales indicadas, por 72 horas. Pasado este tiempo se colectó el sobrenadante y se centrifugó por 8 minutos a 800 RPM. Las células fueron resuspendidas en nuevo medio Ex-Cell® ACF y el sobrenadante almacenado a -20°C. Posteriormente las células se cultivaron en frascos de vidrio estériles de 500 mL con un volumen efectivo de 125 mL de medio Ex-Cell® ACF con las mismas condiciones por 72 horas. Finalmente, luego de coleccionar todo el sobrenadante las células fueron preservadas en crioviales con 1 mL de solución de criopreservación.

## Capítulo 4

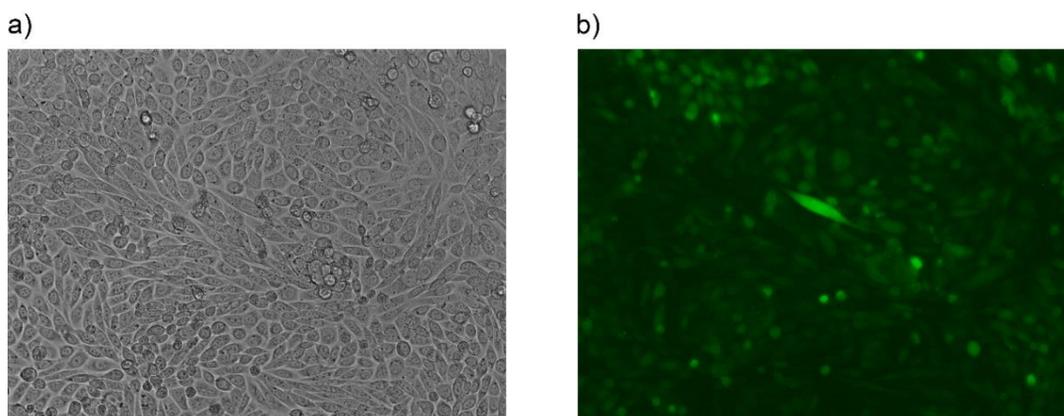
### Resultados

#### Producción de proteína E2 de células CHO 1b cultivadas en adherencia

La línea celular transformada CHO 1b cultivada en condiciones de adherencia produjo en el medio de cultivo la proteína de interés (E2) al alcanzar la confluencia (Figura 3a), momento en el que se podía observar la inmunofluorescencia al excitarla con luz a una longitud de onda entre 510 y 550 nm (Figura 3b).

#### Figura 3

*Células CHO productoras de E21b en condiciones adherentes*

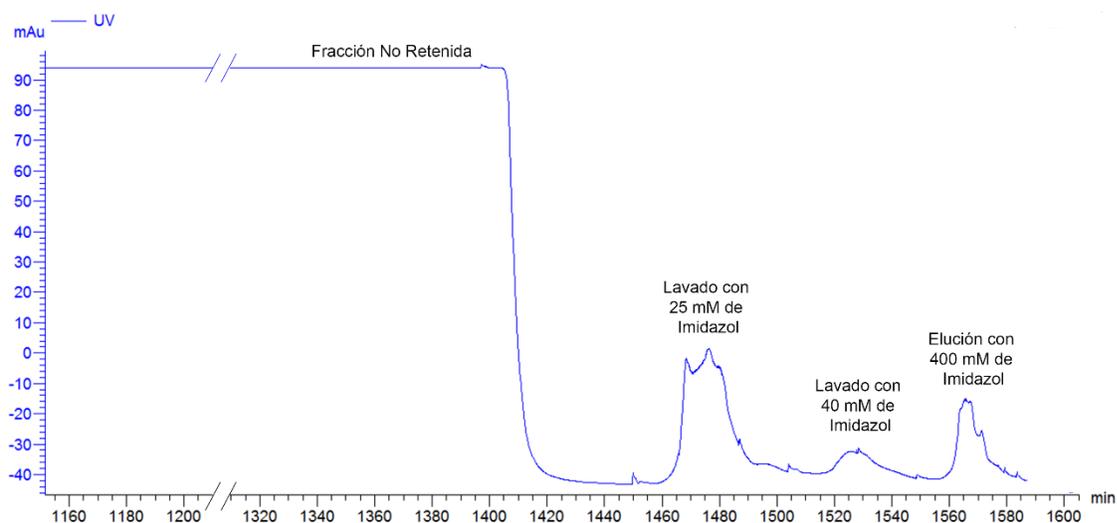


*Nota:* Aumento 100X. a) Células CHO. b) Células CHO fluorescentes

Una vez transcurridas las 72 horas de cultivo, el sobrenadante fue cosechado y la proteína E21b fue purificada mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC). La utilización de concentraciones crecientes de imidazol condujo a la purificación de la proteína obteniéndose una pureza mayor al 60% (Tabla 8) calculada mediante el software ImageJ a partir del gel de poliacrilamida. El análisis de la purificación se realizó mediante SDS-PAGE al 12,5% donde se aplicaron la muestra inicial y las obtenidas durante la purificación: muestra no retenida, lavados (imidazol 25 mM y 40 mM) y elución (imidazol 400 mM) (Figura 4).

## Figura 4

*Cromatograma de purificación de la proteína E2 1b producida en adherencia*

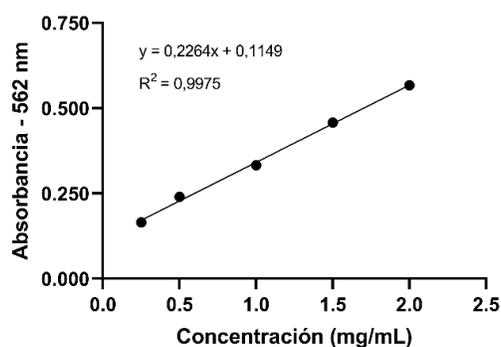


*Nota.* La separación se realizó a un flujo de 2 mL/min y la absorbancia se midió a 280 nm.

La fracción correspondiente a la elución fue dializada y concentrada a 2,5 mL. Durante la etapa de concentración también se colectó la muestra que pasó a través de la membrana para analizar posible pérdida de la proteína. La proteína concentrada fue cuantificada mediante el método BCA, obteniendo una concentración total de proteína de 0,69 mg/mL (Figura 5).

## Figura 5

*Curva estándar de BSA para la cuantificación de proteína E21b mediante BCA*

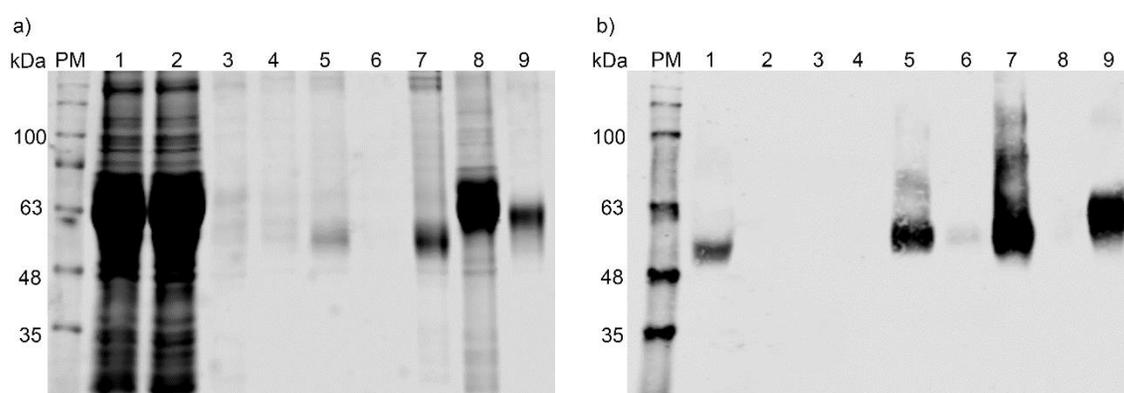


*Nota.* Cada cálculo de concentración se realizó con una curva estándar de BSA nueva

Los análisis en SDS-PAGE y Western blot se realizaron para verificar la presencia de la proteína E21b en la muestra eluida y concentrada del proceso de purificación (Figura 6). Ambos resultados confirmaron la presencia de la proteína E21b, además de determinar el porcentaje de pureza respecto a las proteínas totales en la muestra.

### Figura 6

*Análisis mediante SDS-PAGE y Western blot de la purificación de la proteína E21b producida en condiciones adherentes*



*Nota.* a) SDS-PAGE. b) Western blot. Carriles: PM; Marcador de peso molecular; 1, muestra inicial; 2, muestra no retenida; 3, muestra de lavado (25 mM imidazol); 4, muestra de lavado (40 mM imidazol); 5, muestra de elución (400 Mm imidazol); 6, muestra pass; 7, concentrado de la proteína (3 µg); 8, Control negativo; 9; Control positivo.

Los análisis de SDS-PAGE y Western blot permitieron determinar la presencia de la proteína durante todas las etapas de la purificación (muestra inicial, muestra de elución, concentrado de la proteína). De igual manera, su ausencia en la muestra no retenida y de lavado confirmaron una unión eficiente a la matriz de sefarosa-níquel. Sin embargo, una leve presencia en la muestra pass, sugiere que existió proteína que pudo atravesar el filtro del concentrador.

## Adaptación de células CHO 1b a condiciones en suspensión

### Adaptación de células CHO 1b con reducción del 10% de medio completo

La adaptación de las células CHO del clon productor de la proteína E2 subgenotipo 1b (E21b) a condiciones de cultivo en suspensión se realizó evaluando los parámetros de densidad celular, viabilidad y tiempo de duplicación. El diseño experimental incluyó cultivos suplementados con iones de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  y sin la adición de suplemento. Además, se evaluó la adaptación incrementando en un 10 y 20% el medio Ex-Cell® ACF en el medio de cultivo celular (Tabla 5). Todas las condiciones experimentales se hicieron por duplicado (Anexo 1).

**Tabla 5**

*Adaptación de células CHO 1b a condiciones de crecimiento en suspensión con disminución de 10% de medio completo*

N° Pasaje	Medio Completo: Medio EX-CELL	No Suplementado			Suplementado		
		Densidad celular (cell/ml)	Viabilidad (%)	Tiempo de duplicación (h)	Densidad celular (cell/ml)	Viabilidad (%)	Tiempo de duplicación (h)
0	100:0	1,14E+06	100%	-	1,14E+06	100%	-
1	90:10	1,08E+06	100%	11,71	1,43E+06	100%	10,73
2	80:20	1,55E+06	100%	10,25	2,67E+06	100%	8,86
3	70:30	7,44E+05	100%	13,53	2,11E+06	100%	9,35
4	60:40	7,88E+05	100%	13,05	2,12E+06	100%	9,38
5	50:50	6,49E+05	99,19%	21,07	7,45E+05	100%	13,28
6	40:60	6,48E+05	97,98%	20,97	4,59E+05	100%	16,36
7	30:70	6,24E+05	99,37%	23,10	6,95E+05	100%	20,39
8	20:80	4,68E+05	99,42%	24,38	5,07E+05	100%	23,43
9	10:90	4,78E+05	99,46%	24,07	3,13E+05	95,99%	30,24
10	0:100	3,73E+05	98,65%	27,45	2,15E+05	97,37%	39,65

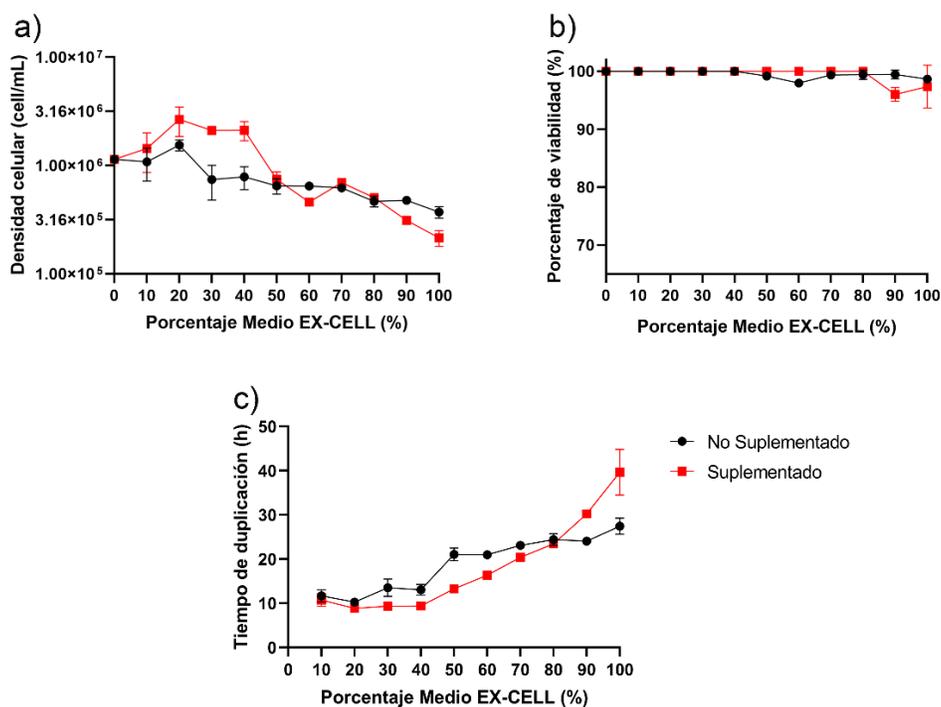
*Nota.* Los valores presentados son el promedio de las réplicas realizadas

La medición de la densidad celular se realizó durante toda la adaptación observándose una disminución en ambas condiciones de adaptación. Sin embargo, la forma en que disminuyó este parámetro fue diferente en cada condición. Mientras en el cultivo no suplementado la mayor disminución sucedió en el pasaje 2 ( $1,55 \times 10^6$  a  $7,44 \times 10^5$  células/mL), en la condición

suplementada la mayor disminución registrada fue en el pasaje 4 ( $2,12 \times 10^6$  hasta  $7,45 \times 10^5$  células/mL). Posterior a los pasajes mencionados los valores no mostraron cambios drásticos en su tendencia a la baja (Tabla 5).

### Figura 7

*Análisis de los parámetros de adaptación de las células CHO 1b con reducción del 10% de medio completo*



*Nota.* a) Densidad celular. b) Porcentaje de viabilidad. c) Tiempo de duplicación.

El suplemento utilizado en la adaptación mejoró dos de los parámetros analizados (densidad celular y tiempo de duplicación) durante la primera mitad del ensayo (50:50 medio completo:medio Ex-Cell), mientras que la viabilidad celular se mantuvo superior al 90% en todos las condiciones de cultivo, sin mostrar cambios que detuvieran la continuidad del proceso. El análisis ANOVA bidireccional seguido de test de Sidak determinó que la densidad celular aumentó significativamente desde el segundo ( $p < 0,004$ ) hasta el cuarto pasaje

( $p < 0,0006$ ) comparada con la condición no suplementada. Posteriormente, los valores no presentaron diferencias significativas entre las condiciones evaluadas. El tiempo de duplicación de las células se ve directamente ligado a la relación inversa que tiene con la densidad celular. Los resultados mostraron que el tiempo de duplicación en los cultivos suplementados fue menor hasta el pasaje 8 respecto a la condición no suplementada (Figura 7). Sin embargo, la diferencia entre las condiciones fue significativa en el pasaje 5 ( $p < 0,0006$ ) y el crecimiento a mayores concentraciones de medio Ex-Cell produjo un aumento significativo del tiempo de duplicación del cultivo suplementado en el pasaje 9 ( $p < 0,007$ ) y 10 ( $p < 0,0001$ ) alcanzando valores cercanos a las 40 horas al final de la adaptación.

Los resultados obtenidos con este diseño experimental no fueron considerados óptimos para la adaptación de un cultivo a crecimiento en suspensión, lo que condujo a un nuevo diseño en el cual se redujo el medio completo en un 20% por pasaje.

#### ***Adaptación de células CHO 1b con reducción del 20% de medio completo***

La adaptación de las células CHO 1b en condiciones adherentes a suspensión se desarrolló de manera rápida en comparación con el tratamiento anterior debido a la reducción del 20% del medio completo. Los parámetros evaluados (densidad celular y viabilidad) no demostraron cambios significativos durante la adaptación según el análisis ANOVA bidireccional seguido de test de Sidak. Sin embargo, el tiempo de duplicación de aproximadamente 25 horas alcanzado por las células al pasaje 5 (Tabla 6) en la condición no suplementada ( $p < 0,006$ ), indica que no se justifica la adición de suplementos en este diseño.

**Tabla 6**

*Adaptación de células CHO 1b a condiciones de crecimiento en suspensión con disminución de 20% de medio completo*

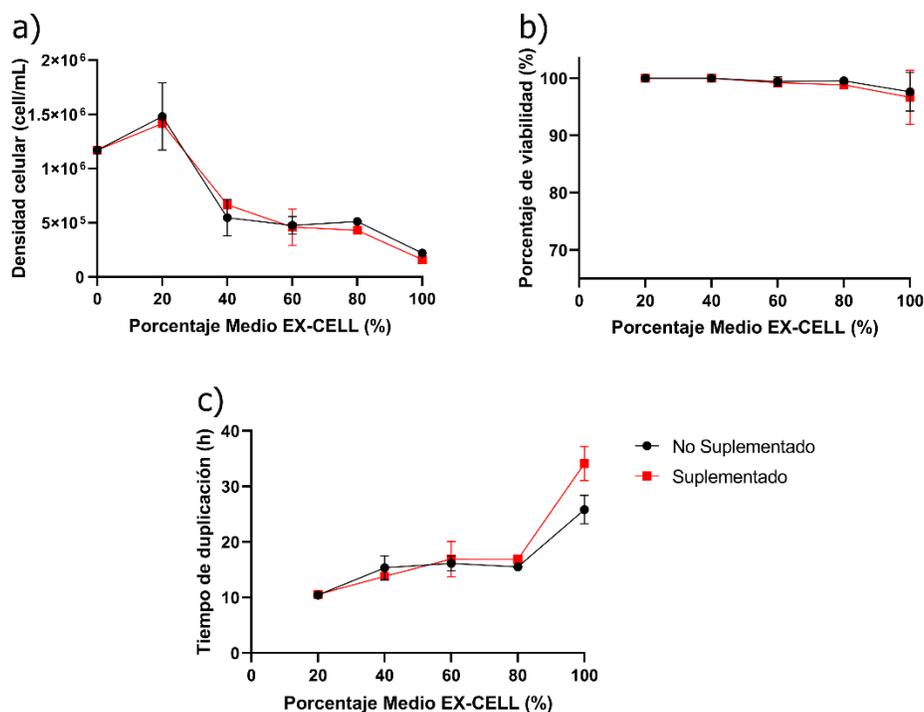
N° Pasaje	Medio Completo: Medio EX-CELL	No Suplementado			Suplementado		
		Densidad celular (cell/ml)	Viabilidad (%)	Tiempo de duplicación (h)	Densidad celular (cell/ml)	Viabilidad (%)	Tiempo de duplicación (h)
0	100:00	1,17E+06	100%	-	1,17E+06	100%	-
1	80:20	1,48E+06	100%	10,44	1,41E+06	100%	10,53
2	60:40	5,48E+05	99,43%	15,36	6,68E+05	99,63%	13,81
3	40:60	4,78E+05	100%	16,15	4,60E+05	98,83%	16,92
4	20:80	5,13E+05	100%	15,53	4,30E+05	98,84%	16,90
5	0:100	2,20E+05	97,62%	25,82	1,60E+05	96,67%	34,13

*Nota.* Los valores presentados son el promedio de las réplicas realizadas

Los valores de densidad celular obtenidos en la condición de adaptación rápida fueron inferiores respecto a los logrados en la adaptación lenta. Esto se pudiera revertir aumentando el tiempo de cultivo, teniendo en cuenta que el cultivo fue de solo 48 horas en este diseño. Del mismo modo, la viabilidad celular no se vio afectada como en el tratamiento previamente mencionado (Figura 8).

## Figura 8

Análisis de los parámetros de adaptación de las células CHO 1b con reducción del 20% de medio completo



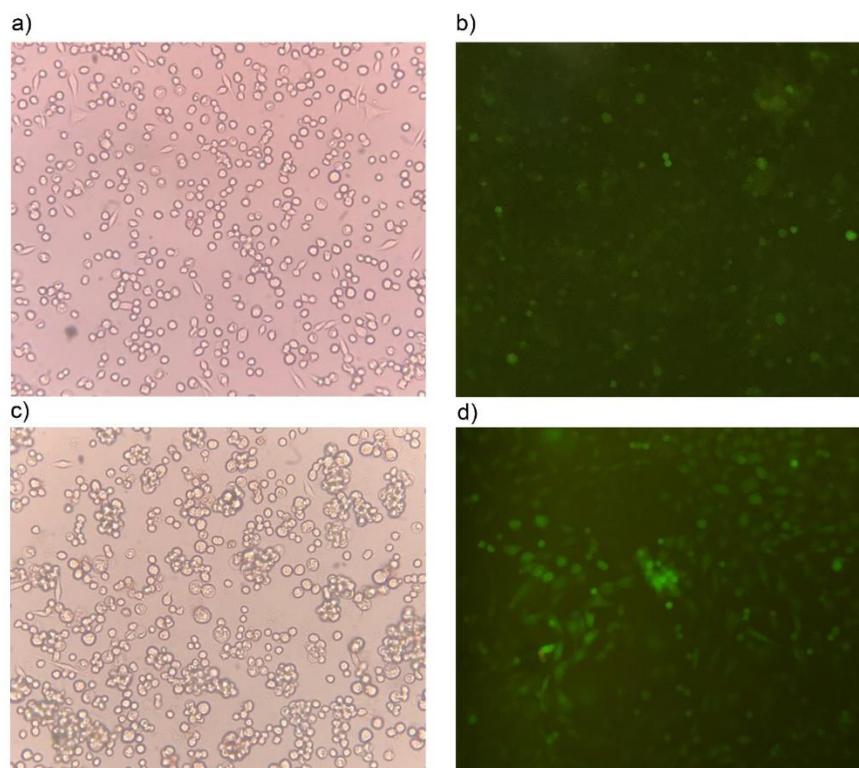
Nota: a) Densidad celular. b) Porcentaje de viabilidad. c) Tiempo de duplicación

## Análisis de la expresión de proteína E2 en cultivo en suspensión

Las células CHO fueron observadas con microscopía de campo claro y de fluorescencia durante todo el proceso de adaptación. Al finalizar la adaptación se identificó diferencia entre los tratamientos. En el caso del tratamiento lento se observaron a las células casi en su totalidad suspendidas en el medio, sin embargo, presentaron una menor intensidad de fluorescencia (Figura 9a-b) respecto a las células cultivadas en adherencia (Figura 3). Por otro lado, las células del tratamiento rápido se observaron más agrupadas entre ellas, pero con mayor intensidad de fluorescencia que las adaptadas mediante el tratamiento lento (Figura 9c-d).

**Figura 9**

*Células CHO al finalizar la adaptación a suspensión*

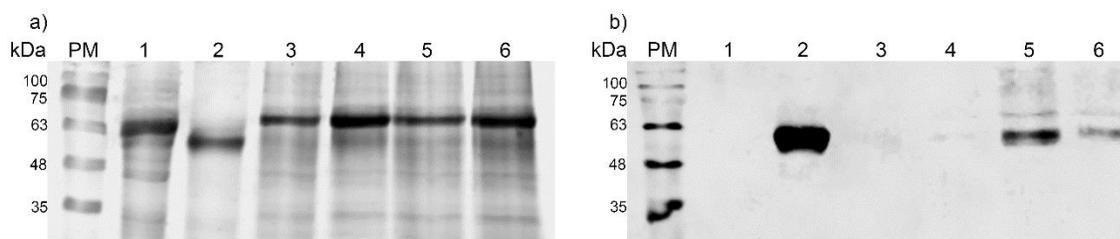


*Nota.* a-b) Células adaptadas a suspensión, tratamiento lento. c-d) Células CHO adaptadas a suspensión, tratamiento rápido.

La proteína E21b producida por las células adaptadas a medio libre de suero Ex-Cell fue analizada mediante geles desnaturalizantes de poliacrilamida SDS-PAGE y Western blot, luego de la precipitación de muestras iniciales para confirmar su presencia en el sobrenadante (Figura 9). La determinación de la expresión de la proteína de interés en el medio de cultivo es un factor clave para verificar la producción a partir de las células adaptadas. Una vez verificado la expresión de la E21b se podría continuar con los pasos de purificación mediante cromatografía.

## Figura 10

### *Análisis de proteína E2 presente en el sobrenadante de los cultivos en suspensión*



*Nota.* a) SDS-PAGE. b) Western blot. Carriles: PM, Marcador de peso molecular; 1, Control negativo; 2 Control positivo; 3, tratamiento lento no suplementado; 4, tratamiento lento suplementado; 5, tratamiento rápido no suplementado; 6, tratamiento rápido suplementado.

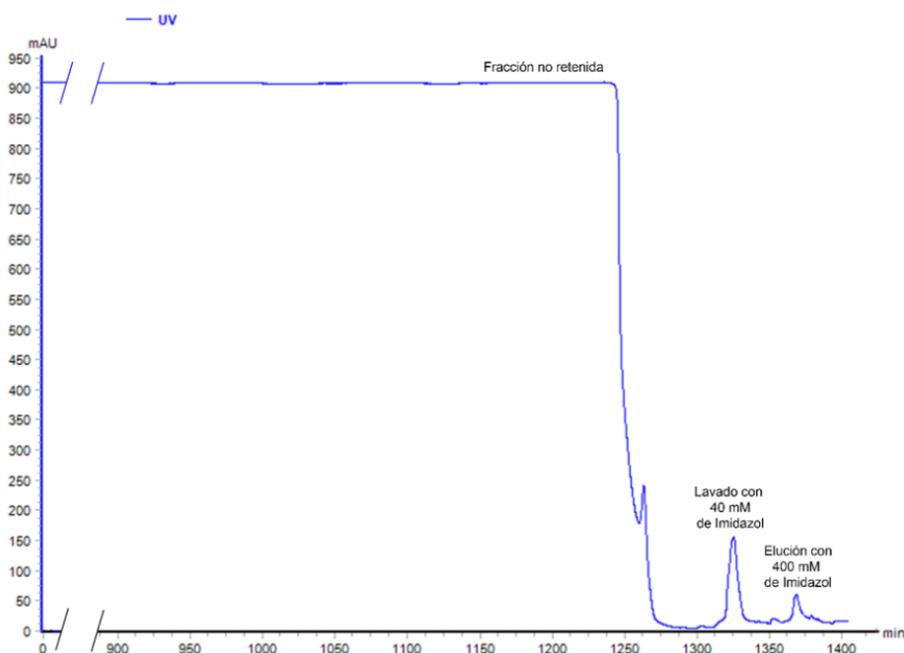
El análisis en gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) mostró bandas entre 48 a 63 kDa, en ambos diseños, que pudieran corresponder a la glicoproteína E21b según su peso molecular (55 kDa aproximadamente). De igual forma, el inmunoensayo específico de Western blot, en el cual se utilizó un anticuerpo anti-His permitió identificar la presencia de la proteína en todos los tratamientos realizados. Sin embargo, la señal más intensa, que demuestra la mayor expresión de E2, se obtuvo en los cultivos realizados en las condiciones suplementada y no suplementada del tratamiento rápido.

### **Purificación de proteína E21b de células cultivadas en suspensión**

El sobrenadante colectado a partir del crecimiento de las células CHO 1b adaptadas a suspensión fue purificado mediante cromatografía IMAC. En el procedimiento de purificación de estas muestras se incluyó un solo paso de lavado a 40 mM de imidazol. La elución se mantuvo con imidazol 400 mM (Figura 11).

## Figura 11

*Cromatograma de purificación de la proteína E21b producida en suspensión*



*Nota:* Se muestra la condición no suplementada del tratamiento lento

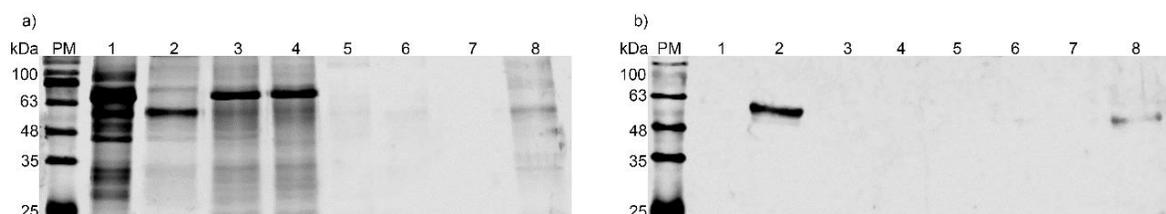
El cromatograma de la purificación de los sobrenadantes de células adaptadas a suspensión generó una lectura de señal entre los 900 y 1200 mAu a diferencia del de células adherentes que alcanzó un máximo de 100 mAu (Figura 4). De igual manera la absorbancia correspondiente a las fracciones de lavado y elución mostraron concordancia con la señal marcada siendo superior en el caso de las células cultivadas en medio libre de suero.

La proteína eluida con 400 mM de imidazol y concentrada fue cuantificada y posteriormente analizada mediante geles desnaturalizantes de poliacrilamida SDS-PAGE y Western blot. El análisis en SDS-PAGE sugiere la presencia de la proteína E2 en las muestras inicial, elución y concentrada de la proteína por la banda observada entre 48 y 63 kDa. Sin embargo, debido a una baja concentración de la misma, la banda se marca de forma leve en

comparación con las células cultivadas en adherencia. En el ensayo inmunoenzimático Western blot se identificó únicamente en la muestra concentrada de la proteína (Figura 12).

## Figura 12

### *Análisis de proteína E2 purificada del sobrenadante de los cultivos suspensión*



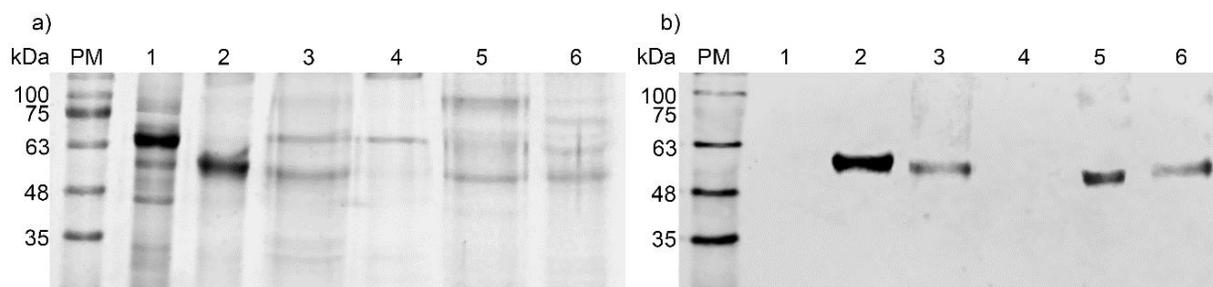
*Nota.* a) SDS-PAGE. b) Western Blot. Carriles: PM, Marcador de peso molecular; 1, Control negativo; 2 Control positivo; 3, muestra inicial; 4, muestra no retenida; 5, muestra de lavado (40 mM imidazol); 6, muestra de elución (400 Mm imidazol); 7, muestra pass; 8, concentrado de la proteína (4 µg).

### **Análisis de la proteína E21b purificada obtenida en suspensión**

Las concentraciones de proteína E21b obtenidas luego de la purificación y análisis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE y Western Blot) no fueron eficientes para determinar la concentración real de la misma. Por ese motivo se realizó un nuevo ensayo con las proteínas purificadas de todos los tratamientos y condiciones realizadas. En estos fue posible identificar la presencia de la proteína a una altura entre 48 y 63 kDa correspondiente a E2 y un marcaje específico por Western blot que denota su presencia en todos los tratamientos. Sin embargo, en el tratamiento lento suplementado, su señal es casi nula debido a la baja concentración alcanzada (Figura 13).

**Figura 13**

*Proteína E21b concentrada de todos los tratamientos*



*Nota.* a) SDS-PAGE. b) Western Blot. Carriles: PM, Marcador de peso molecular; 1, Control negativo; 2 Control positivo; 3, tratamiento lento no suplementado; 4, tratamiento lento suplementado; 5, tratamiento rápido no suplementado; 6, tratamiento rápido suplementado

El proceso de N-glicosilación que ocurre en las células CHO 1b agrega glicanos de distintos tamaños en los sitios potenciales de N-glicosilación de la cadena polipeptídica, conocido como heterogeneidad por sitio. Esta modificación hace que la glicoproteína se visualice en SDS-PAGE y Western blot como una banda difusa característica de las proteínas N glicosiladas (Figura 13).

**Tabla 7**

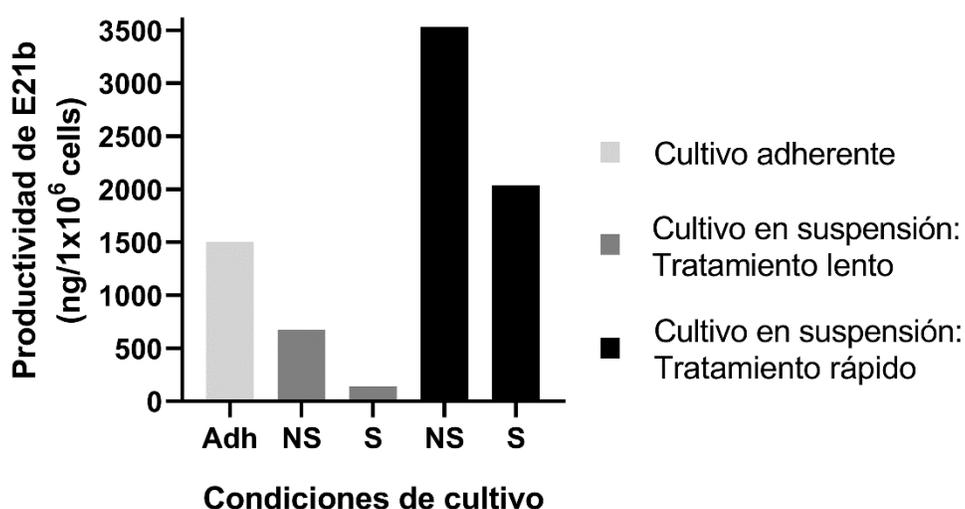
Producción de proteína E21b en todos los tratamientos

Tratamiento	Condición	Volumen inicial (mL)	Volumen concentrado (mL)	Concentración proteínas totales (µg/mL)	Pureza (%)	Concentración E21b concentrado (µg/mL)	Concentración E21b en el cultivo (µg/mL)
Cultivo adherente	Cultivo adherente	900	2,5	690	62,62	432,08	1,22
Reducción del 10% de medio completo	No suplementado	590	2,2	184,54	36,65	67,63	0,25
	Suplementado	450	3	15,54	28,68	4,46	0,03
Reducción del 20% de medio completo	No suplementado	450	4,1	572,88	14,89	85,3	0,78
	Suplementado	500	1,5	398,21	27,26	108,55	0,33

El análisis de las proteínas por SDS-PAGE y Western Blot nos permite confirmar la presencia de E21b en el medio libre de suero, sin embargo, factores como el volumen inicial de producción, el volumen concentrado, la concentración de proteínas totales y la pureza influyen en la concentración alcanzada al final de los tratamientos. El cultivo adherente obtuvo la mayor concentración de proteína E21b en el cultivo (1,22  $\mu\text{g/mL}$ ) en comparación con los cultivos adaptados a suspensión independientemente de las condiciones de crecimiento evaluadas. El tratamiento con reducción del 20% de medio completo presentó mejores resultados de concentración en el cultivo (0,33-0,78  $\mu\text{g/mL}$ ) que en el que se redujo el 10% del mismo (0,03-0,25  $\mu\text{g/mL}$ ). El mejor porcentaje de pureza posterior a la purificación se alcanzó en la proteína obtenida en cultivo adherente con el 62,62%, superando ampliamente a los cultivos adaptados a suspensión (Tabla 7).

#### Figura 14

*Comparación de productividad de E21b en cada condición de cultivo*



*Nota.* NS, no suplementado; S, suplementado

La productividad de expresión de la proteína E21b puede ser medida de manera eficaz con el número de células que produjeron la cantidad total de proteína en el medio de cultivo. Esto arrojó resultados que demostraron una mejor producción de proteína en los cultivos en suspensión del tratamiento rápido que en condiciones adherentes. Sin embargo, el tratamiento lento en sus dos condiciones se mantuvo por debajo del cultivo en adherencia (Tabla 8) (Figura 14).

**Tabla 8**

*Productividad específica de E21b en cada tratamiento*

Tratamiento	Condición	Densidad celular al final (cell/mL)	Volumen final (mL)	N° de células totales	[E21b] ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volumen concentrado (mL)	Cantidad de proteína ( $\mu\text{g}$ )	Expresión E21b ( $\text{ng}/1 \times 10^6$ cell)
Cultivo adherente	Cultivo adherente	8,00E+05	900	7,20E+08	432,08	2,5	1080,2	1500,28
Reducción 10% de medio completo	No suplementado	3,73E+05	590	2,20E+08	67,63	2,2	148,786	676,08
	Suplementado	2,15E+05	450	9,68E+07	4,46	3	13,38	138,29
Reducción del 20% de medio completo	No suplementado	2,20E+05	450	9,90E+07	85,3	4,1	349,73	3532,63
	Suplementado	1,60E+05	500	8,00E+07	108,55	1,5	162,825	2035,31

*Nota.* [ ]: concentración

## Capítulo 5

### Discusión

La adaptación de cultivos celulares a suspensión comprende un proceso rutinario en las empresas biotecnológicas productoras de biofármacos, para la expresión de proteínas recombinantes. El cultivo en suspensión presenta como ventajas el crecimiento rápido a altas densidades celulares, mayor seguridad biológica y disminución de costos (Arthuso et al., 2012). Usualmente la adaptación de células CHO de condiciones adherentes a suspensión se realiza con la reducción gradual de suero fetal bovino (SFB) (Jukić et al., 2016).

En el presente trabajo las células CHO se adaptaron a escala de laboratorio con el fin de establecer el proceso de producción de la proteína recombinante E2 del BVDv 1b para una futura aplicación de un candidato vacunal. Este procedimiento partió de un clon cultivado en condiciones adherentes. Las diferentes estrategias de adaptación tuvieron como antecedentes los resultados publicados por Wu et al., (2021) En la primera etapa se diseñó la adaptación con reducción del 10% de medio completo por pasaje denominándose tratamiento lento. Sin embargo, debido a la baja expresión de la proteína E21b, se realizó una nueva adaptación con reducción del 20% de medio completo por pasaje, la misma que se denominó tratamiento rápido.

La adaptación realizada en la presente investigación evaluó la adición de sales de calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) y magnesio ( $\text{Mg}^{+2}$ ) que pudieran influir positivamente en los parámetros de adaptación considerados (densidad celular, viabilidad celular y tiempo de duplicación) a la vez que se comparaba con una condición no suplementada. Este suplemento se seleccionó debido a los niveles de calcio y magnesio usualmente más bajos en medios libres de suero y a la importancia que tiene el calcio en las funciones vitales de las células como: actividades enzimáticas, motilidad, morfología de los tejidos, proceso metabólicos, transducción de

señales, replicación y fijación celular a los sustratos (Conrad, 2023). Además, el magnesio es uno de los iones metálicos polivalentes que interactúa con los sitios de unión de calcio, lo que favorece la actividad celular (W. H. Kim et al., 2009).

Sin embargo, la concentración de estos suplementos añadidos al medio de cultivo debe ser sustancialmente baja, ya que en exceso el calcio puede afectar la unión, señalización y diferenciación celular (Conrad, 2023). Concentraciones superiores a 4 mM de  $\text{Ca}^{+2}$  y 2 mM de  $\text{Mg}^{+2}$  son tóxicas para los cultivos celulares (Wu et al., 2021), motivo por el cual se utilizaron concentraciones de 2,54 mM de  $\text{CaCl}_2$  y 1,42 mM de  $\text{MgCl}_2$ .

En el tratamiento lento fue posible observar que los suplementos de calcio y magnesio utilizados mejoraron parcialmente el proceso de adaptación de las células adherentes a suspensión presuntamente debido a la capacidad de recuperar la función y biogénesis de la integrina celular (Wu et al., 2021) que cumple un papel fundamental de regulación de la adhesión y señalización de la matriz celular y actúa en diferentes actividades relacionadas a la duplicación y al mantenimiento celular (Walther et al., 2016).

Sin embargo, al finalizar la adaptación de las células, en el último pasaje de ambos tratamientos de las condiciones suplementadas, se obtuvo un aumento significativo del tiempo de duplicación. Esta variación en la tendencia del parámetro puede estar relacionada por una forma específica de apoptosis llamada anoikis que ocurre cuando se interrumpe la señalización de la integrina por la falta de contacto entre la matriz extracelular y la célula al momento de retirar todo el SFB (Walther et al., 2016), produciendo una gran disminución en la densidad celular y por ende un aumento significativo del tiempo de duplicación.

En general se obtuvo un crecimiento y viabilidad adecuado para las células CHO después de un proceso de adaptación a medio libre de suero tanto en el tratamiento lento, como en el rápido que requirieron de 55 y 21 días respectivamente. Estos valores contrastan

con los 130 días de adaptación de células CHO productoras de eritropoyetina humana recombinante (Jukić et al., 2016), pero se asemejan a los 27 y 65 días de adaptación de células CHO DP-12 (Wu et al., 2021) y a los 40 días de adaptación células CHO productoras de prolactina humana (Arthuso et al., 2012).

La diferencia observada entre la expresión de la proteína E21b de las células del tratamiento lento (676,08 ng/1x10<sup>6</sup> células en la condición no suplementada) y las del tratamiento rápido (3532,63 ng/1x10<sup>6</sup> cells condición no suplementada) se pueden justificar al analizar los componentes del cassette genético con el que las células fueron transfectadas. El promotor de citomegalovirus (CMV) si bien logra altos niveles de expresión génica para la producción de proteínas recombinantes, es propenso a silenciarse luego de la transfección en el genoma de la célula huésped (Damdindorj et al., 2012). Esta característica se observó en el estudio de (Norrman et al., 2010) que registró una regulación a la baja del promotor CMV luego de 50 días de cultivo de células madre embrionarias humanas (hESC) que expresaban un gen eGFP. Lo mismo ocurrió con las señales GFP generadas por el promotor CMV en líneas celulares de cáncer de pulmón A549 y una línea celular epitelial de mama no tumorigénica MCF-10<sup>a</sup> luego de 45 días, siendo las menores registradas en el estudio de Damdindorj et al., (2012). Esta condición del promotor de CMV explicaría la baja concentración alcanzada al finalizar la adaptación y las diferencias significativas entre los tratamientos rápido y lento debido al tiempo empleado.

La expresión de la proteína E2 1b producida en células de mamífero CHO 1b alcanzó mejores concentraciones en el sobrenadante del cultivo adherente (1,22 µg/mL) que en las condiciones adaptada a suspensión (0,03–0,78 µg/mL). La proteína E2 ha sido expresada de manera truncada en *Escherichia coli* con un rendimiento de entre 1-2 µg/mL de cultivo bacteriano (Cavallaro et al., 2011); también en *Nicotiana tabacum* mediada por *Agrobacterium tumefaciens* con expresión de 20 µg por gramo de hojas frescas (Nelson et al., 2012) y en la

superficie de levaduras *Sacharomyces cerevisiae* mediante el vector pyD1 (Patterson et al., 2012).

Otros sistemas de expresión también han producido la proteína E2 como el de larvas de gusano de seda infectado con baculovirus, alcanzando un rendimiento de 0,68 mg/mL (Lee et al., 2012) y en células de insecto usando un vector de expresión de baculovirus se obtuvo concentraciones 1 a 3 mg/mL posterior a la purificación de la proteína del medio de cultivo (Pande et al., 2005), siendo el mayor rendimiento registrado en la literatura. Estos rendimientos son superiores a los alcanzados en este estudio que llegaron a 0,432 mg/mL luego de la purificación en condiciones adherentes y entre 0,004 y 0,108 mg/mL en suspensión.

Sin embargo, se debe considerar que el objetivo del presente estudio realizado a escala de laboratorio fue la adaptación de la línea celular, por lo que las concentraciones alcanzadas pueden ser mejoradas mediante la optimización de las condiciones y tiempo de cultivos celulares. Además, el efecto antigénico de la proteína E21b a producir en una vacuna de subunidades se estima superior a las de otros sistemas de expresión debido a que la inmunogenicidad, eficacia, bioactividad, farmacocinética y farmacodinámica que otorgan las modificaciones postraduccionales generadas en células CHO (Butler, 2006).

El esquema de purificación utilizado para la elución de la proteína E21b contenida en el sobrenadante incluyó un lavado con buffer de equilibrio con imidazol al 40 mM y elución con imidazol 400 mM. Sin embargo, presentó dificultades al remover contaminantes entre 63 y 100 kDa. El estudio de (Pande et al., 2005) señala un esquema de purificación escalonado con imidazol 10, 20, 40, 60, 100, 300 y 500 mM. De igual manera (Cavallaro et al., 2011) utiliza un diseño de adición progresiva de imidazol que pasa por 50, 80, 100 y 150 mM, encontrándose a esta última concentración la principal especie eluida de la columna. Ambos estudios obtuvieron altas puridades debido a la aplicación creciente de varias concentraciones de imidazol.

En el presente trabajo se agregó imidazol 5 mM en el buffer de unión y en la muestra equilibrada por su capacidad como agente competitivo para reducir la unión de proteínas contaminantes y así aumentar la pureza final. Sin embargo, no fue suficiente y las proteínas de tamaño superior a 63 kDa se mantuvieron en la columna durante el lavado, lo que representó contaminación en la fracción eluida y posteriormente concentrada. Entre las recomendaciones mencionadas por la [ficha técnica](#) de la marca de la matriz de separación Sefarosa High Performance se presentan resultados con baja pureza al utilizar 5 mM de imidazol en el buffer de unión al purificar una proteína APB7 con cola de histidina, pero mejoran al agregar 50 mM de imidazol en el buffer de unión y muestra. Esto sugiere que los resultados obtenidos con el esquema de purificación utilizado no fueron los mejores debido a la baja concentración de imidazol utilizada para equilibrar la columna y la muestra, sumado, en el caso de los cultivos en suspensión, a la cantidad de componentes biológicos naturales del crecimiento celular contenidos en el sobrenadante del cultivo.

## Capítulo 6

### Conclusiones

- El suplemento de iones  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  aumenta parcialmente la densidad celular y disminuye el tiempo de duplicación durante la adaptación del cultivo a suspensión únicamente en el tratamiento lento.
- El uso de suplemento en el medio de cultivo libre de suero no repercute significativamente en la expresión de la proteína E21b producida en células CHO adaptadas a condiciones en suspensión.
- La productividad específica de expresión de proteína E21b es mayor en células adaptadas a suspensión con un tratamiento rápido en relación al cultivo en adherencia y al tratamiento de adaptación lento.

### Recomendaciones

- Evaluar concentraciones de CO<sub>2</sub> superiores a 5% por la influencia directa en la expresión de proteínas recombinantes producidas por células CHO cultivadas en condiciones en suspensión.
- El esquema de purificación por cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC) puede ser optimizado utilizando mayores concentraciones de imidazol en el buffer de unión y en la muestra, en conjunto con más pasos de elución que permitan eliminar la mayor cantidad de contaminantes.
- A partir de las células adaptadas a suspensión se recomienda aumentar el volumen de cultivo para corroborar la productividad específica de la proteína E21b.

## Capítulo 7

### Bibliografía

- Abdelsalam, K., Rajput, M., Elmowalid, G., Sobraske, J., Thakur, N., Abdallah, H., Ali, A. A. H., & Chase, C. C. L. (2020). The Effect of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Strains and the Corresponding Infected-Macrophages' Supernatant on Macrophage Inflammatory Function and Lymphocyte Apoptosis. *Viruses*, *12*(7). <https://doi.org/10.3390/V12070701>
- Al-Kubati, A. A. G., Hussen, J., Kandeel, M., Al-Mubarak, A. I. A., & Hemida, M. G. (2021). Recent Advances on the Bovine Viral Diarrhea Virus Molecular Pathogenesis, Immune Response, and Vaccines Development. *Frontiers in Veterinary Science*, *8*, 665128. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2021.665128>
- Almeida, H. M. de S., Gatto, I. R. H., Nascimento, K. A., Dreibi, M. L. M., Samara, S. I., & Oliveira, L. G. (2019). Detection and assessment of antibodies against bovine viral diarrhea virus in swine serum using the virus neutralization assay. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, *13*(1), 1–14. <https://doi.org/10.5935/RBHSA.V13I1.489>
- Arnold, U., & Ulbrich-Hofmann, R. (1999). Quantitative protein precipitation from guanidine hydrochloride-containing solutions by sodium deoxycholate/trichloroacetic acid. *Analytical Biochemistry*, *271*(2), 197–199. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1999.4149>
- Arthuso, F. S., Bartolini, P., & Soares, C. R. J. (2012). Laboratory production of human prolactin from CHO cells adapted to serum-free suspension culture. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *167*(8), 2212–2224. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9745-1>
- Bandaranayake, A. D., & Almo, S. C. (2014). Recent advances in mammalian protein production. *FEBS Letters*, *588*(2), 253. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2013.11.035>

- Bauermann, F. V., Ridpath, J. F., Weiblen, R., & Flores, E. F. (2013). HoBi-like viruses: An emerging group of pestiviruses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25(1), 6–15. <https://doi.org/10.1177/1040638712473103>
- Bellido, D., Baztarrica, J., Rocha, L., Pecora, A., Acosta, M., Escribano, J. M., Parreño, V., & Wigdorovitz, A. (2021). A novel MHC-II targeted BVDV subunit vaccine induces a neutralizing immunological response in guinea pigs and cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(6), 3474–3481. <https://doi.org/10.1111/TBED.13952>
- Bielanski, A., Algire, J., Lalonde, A., & Nadin-Davis, S. (2009). Transmission of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) via in vitro-fertilized embryos to recipients, but not to their offspring. *Theriogenology*, 71(3), 499–508. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2008.08.015>
- Butler, M. (2006). Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by Mammalian cell systems. *Cytotechnology*, 50(1–3), 57–76. <https://doi.org/10.1007/S10616-005-4537-X>
- Cavallaro, A. S., Mahony, D., Commins, M., Mahony, T. J., & Mitter, N. (2011). Endotoxin-free purification for the isolation of Bovine Viral Diarrhoea Virus E2 protein from insoluble inclusion body aggregates. *Microbial Cell Factories*, 10, 57. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-57>
- Chase, C. C. L. (2013). The impact of BVDV infection on adaptive immunity. *Biologicals*, 41(1), 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.09.009>
- Chase, C. C. L., Elmowalid, G., & Yousif, A. A. A. (2004). The immune response to bovine viral diarrhoea virus: a constantly changing picture. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 20(1), 95–114. <https://doi.org/10.1016/J.CVFA.2003.11.004>

- Conrad, D. (2023). *Calcium in Cell Culture*. <https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/calcium-in-cell-culture>
- da Silva Silveira, C., Maya, L., Casaux, M. L., Schild, C., Caffarena, D., Aráoz, V., da Costa, R. A., Macías-Rioseco, M., Perdomo, Y., Castells, M., Colina, R., Fraga, M., Riet-Correa, F., & Giannitti, F. (2020). Diseases associated with bovine viral diarrhoea virus subtypes 1a and 2b in beef and dairy cattle in Uruguay. *Brazilian Journal of Microbiology*, *51*(1), 357. <https://doi.org/10.1007/S42770-019-00170-7>
- Damdindorj, L., Karnan, S., Ota, A., Takahashi, M., Konishi, Y., Hossain, E., Hosokawa, Y., & Konishi, H. (2012). Assessment of the long-term transcriptional activity of a 550-bp-long human  $\beta$ -actin promoter region. *Plasmid*, *68*(3), 195–200. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2012.07.003>
- Darweesh, M. F., Rajput, M. K. S., Braun, L. J., Rohila, J. S., & Chase, C. C. L. (2018). BVDV Npro protein mediates the BVDV induced immunosuppression through interaction with cellular S100A9 protein. *Microbial Pathogenesis*, *121*, 341. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2018.05.047>
- Falcone, E., Tollis, M., & Conti, G. (1999). Bovine viral diarrhoea disease associated with a contaminated vaccine. *Vaccine*, *18*(5–6), 387–388. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00244-3](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00244-3)
- Falkenberg, S. M., Dassanayake, R. P., Terhaar, B., Ridpath, J. F., Neill, J. D., & Roth, J. A. (2021). Evaluation of Antigenic Comparisons Among BVDV Isolates as it Relates to Humoral and Cell Mediated Responses. *Frontiers in Veterinary Science*, *8*, 685114. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2021.685114>

- Feng, Z., Li, X., Fan, B., Zhu, C., & Chen, Z. (2022). Maximizing the Production of Recombinant Proteins in Plants: From Transcription to Protein Stability. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21). <https://doi.org/10.3390/IJMS232113516>
- Francis, M. J. (2018). Recent Advances in Vaccine Technologies. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 48(2), 231. <https://doi.org/10.1016/J.CVSM.2017.10.002>
- Fulton, R. W., Cook, B. J., Payton, M. E., Burge, L. J., & Step, D. L. (2020). Immune response to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) vaccines detecting antibodies to BVDV subtypes 1a, 1b, 2a, and 2c. *Vaccine*, 38(24), 4032–4037. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2020.03.058>
- Gecchele, E., Merlin, M., Brozzetti, A., Falorni, A., Pezzotti, M., & Avesani, L. (2015). A Comparative Analysis of Recombinant Protein Expression in Different Biofactories: Bacteria, Insect Cells and Plant Systems. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 2015(97), 52459. <https://doi.org/10.3791/52459>
- Ghaderi, D., Zhang, M., Hurtado-Ziola, N., & Varki, A. (2012). Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 28, 147–176. <https://doi.org/10.5661/BGER-28-147>
- Givens, M. D., & Newcomer, B. W. (2015). Perspective on BVDV control programs. *Animal Health Research Reviews*, 16(1), 78–82. <https://doi.org/10.1017/S1466252315000043>
- Glew, E. J., Carr, B. V., Brackenbury, L. S., Hope, J. C., Charleston, B., & Howard, C. J. (2003). Differential effects of bovine viral diarrhoea virus on monocytes and dendritic cells. *The Journal of General Virology*, 84(Pt 7), 1771–1780. <https://doi.org/10.1099/VIR.0.18964-0>

- Hamers, C., Di Valentin, E., Lecomte, C., Lambot, M., Joris, E., Genicot, B., & Pastoret, P. P. (2000). Virus neutralizing antibodies against a panel of 18 BVDV isolates in calves vaccinated with Rispoval RS-BVD. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, *47*(10), 721–726. <https://doi.org/10.1046/J.1439-0450.2000.00405.X>
- Hamers, C., Di Valentin, E., Lecomte, C., Lambot, M., Joris, E., Genicot, B., & Pastoret, P. P. (2002). Virus neutralising antibodies against 22 bovine viral diarrhoea virus isolates in vaccinated calves. *Veterinary Journal*, *163*(1), 61–67. <https://doi.org/10.1053/tvjl.2001.0638>
- Houe, H. (1999). Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Veterinary Microbiology*, *64*(2–3), 89–107. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00262-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00262-4)
- Houe, H. (2003). Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals*, *31*(2), 137–143. [https://doi.org/10.1016/S1045-1056\(03\)00030-7](https://doi.org/10.1016/S1045-1056(03)00030-7)
- Houe, H., Lindberg, A., & Moennig, V. (2006). Test Strategies in Bovine Viral Diarrhea Virus Control and Eradication Campaigns in Europe. <https://doi.org/10.1177/104063870601800501>, *18*(5), 427–436. <https://doi.org/10.1177/104063870601800501>
- Isken, O., Postel, A., Bruhn, B., Lattwein, E., Becher, P., & Tautz, N. (2019). CRISPR/Cas9-Mediated Knockout of DNAJC14 Verifies This Chaperone as a Pivotal Host Factor for RNA Replication of Pestiviruses. *Journal of Virology*, *93*(5). <https://doi.org/10.1128/JVI.01714-18>
- Jelsma, H., Loeffen, W. L. A., van Beuningen, A., & van Rijn, P. A. (2013). Preliminary mapping of non-conserved epitopes on envelope glycoprotein E2 of Bovine viral diarrhea virus type 1 and 2. *Veterinary Microbiology*, *166*(1–2), 195–199. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2013.06.008>

- Jukić, S., Bubenik, D., Pavlović, N., Tušek, A. J., & Srček, V. G. (2016). Adaptation of CHO cells in serum-free conditions for erythropoietin production: Application of EVOP technique for process optimization. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 63(5), 633–641.  
<https://doi.org/10.1002/bab.1468>
- Khan, A. H., Bayat, H., Rajabibazl, M., Sabri, S., & Rahimpour, A. (2017). Humanizing glycosylation pathways in eukaryotic expression systems. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 33(1). <https://doi.org/10.1007/S11274-016-2172-7>
- Khodakaram-Tafti, A., & Farjanikish, G. H. (2017). Persistent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in cattle herds. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 18(3), 154.  
<https://doi.org/10.22099/ijvr.2017.4190>
- Kim, J. Y., Kim, Y. G., & Lee, G. M. (2012). CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: Current state and further potential. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 93, Issue 3, pp. 917–930). <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3758-5>
- Kim, W. H., Kim, J. S., Yoon, Y., & Lee, G. M. (2009). Effect of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> concentration in culture medium on the activation of recombinant factor IX produced in Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biotechnology*, 142(3–4), 275–278.  
<https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2009.06.001>
- Koethe, S., König, P., Wernike, K., Pfaff, F., Schulz, J., Reimann, I., Makoschey, B., & Beer, M. (2020). A Synthetic Modified Live Chimeric Marker Vaccine against BVDV-1 and BVDV-2. *Vaccines*, 8(4), 1–23. <https://doi.org/10.3390/VACCINES8040577>
- Kuca, T., Passler, T., Newcomer, B. W., Neill, J. D., Galik, P. K., Riddell, K. P., Zhang, Y., Bayles, D. O., & Walz, P. H. (2020). Changes Introduced in the Open Reading Frame of Bovine Viral Diarrhoea Virus During Serial Infection of Pregnant Swine. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01138/FULL>

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970 227:5259, 227(5259), 680–685.  
<https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lanyon, S. R., Hill, F. I., Reichel, M. P., & Brownlie, J. (2014). Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis. In *Veterinary Journal* (Vol. 199, Issue 2, pp. 201–209).  
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.07.024>
- Laureyns, J., Ribbens, S., & de Kruif, A. (2010). Control of bovine virus diarrhoea at the herd level: Reducing the risk of false negatives in the detection of persistently infected cattle. *The Veterinary Journal*, 184(1), 21–26. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2008.11.014>
- Lee, K. S., Sohn, M. R., Kim, B. Y., Choo, Y. M., Woo, S. D., Yoo, S. S., Je, Y. H., Choi, J. Y., Roh, J. Y., Koo, H. N., & Jin, B. R. (2012). Production of classical swine fever virus envelope glycoprotein E2 as recombinant polyhedra in baculovirus-infected silkworm larvae. *Molecular Biotechnology*, 50(3), 211–220. <https://doi.org/10.1007/s12033-011-9431-5>
- Li, Y., Wang, J., Kanai, R., & Modis, Y. (2013). Crystal structure of glycoprotein E2 from bovine viral diarrhoea virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(17), 6805–6810. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1300524110/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Liebler-Tenorio, E. M., Ridpath, J. F., & Neill, J. D. (2004). *Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent and acute infection with the homologous strain of noncytopathic bovine viral diarrhoea virus.*
- Lindberg, A., & Houe, H. (2005). Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) of relevance to control. *Preventive Veterinary Medicine*, 72(1–2), 55–73.  
<https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2005.07.018>

- Liu, C., Liu, Y., Liang, L., Cui, S., & Zhang, Y. (2019). RNA-Seq based transcriptome analysis during bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection. *BMC Genomics*, 20(1).  
<https://doi.org/10.1186/S12864-019-6120-4>
- Liu, Y., Wu, C., Chen, N., Li, Y., Fan, C., Zhao, S., Bai, T., Zhao, Z., Chen, J., Su, S., Zhang, Z., Zhou, Y., & Zhu, Z. (2021). PD-1 Blockade Restores the Proliferation of Peripheral Blood Lymphocyte and Inhibits Lymphocyte Apoptosis in a BALB/c Mouse Model of CP BVDV Acute Infection. *Frontiers in Immunology*, 12.  
<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.727254/FULL>
- Lysholm, S., Ramabu, S. S., Berg, M., & Wensman, J. J. (2019). First-time detection of bovine viral diarrhoea virus, BVDV-1, in cattle in Botswana. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 86(1). <https://doi.org/10.4102/OJVR.V86I1.1764>
- Ma, Y., Wang, L., Jiang, X., Yao, X., Huang, X., Zhou, K., Yang, Y., Wang, Y., Sun, X., Guan, X., & Xu, Y. (2022). Integrative Transcriptomics and Proteomics Analysis Provide a Deep Insight Into Bovine Viral Diarrhea Virus-Host Interactions During BVDV Infection. *Frontiers in Immunology*, 13, 1. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.862828>
- Merwaiss, F., Czibener, C., & Alvarez, D. E. (2019). Cell-to-Cell Transmission Is the Main Mechanism Supporting Bovine Viral Diarrhea Virus Spread in Cell Culture. *Journal of Virology*, 93(3). <https://doi.org/10.1128/JVI.01776-18>
- Mizukami, A., Caron, A. L., Picanço-Castro, V., & Swiech, K. (2018). Platforms for recombinant therapeutic glycoprotein production. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1674, pp. 1–14). Humana Press Inc. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7312-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7312-5_1)
- Moennig, V., & Becher, P. (2018). Control of Bovine Viral Diarrhea. *Pathogens*, 7(1).  
<https://doi.org/10.3390/PATHOGENS7010029>

- Montesino, R., Gutiérrez, N., Camacho, F., Farnós, O., Andrades, S., González, A., Acosta, J., Cortez-San Martín, M., Sánchez, O., Ruiz, A., & Toledo, J. R. (2019). Multi-antigenic recombinant subunit vaccine against *Lawsonia intracellularis*: The etiological agent of porcine proliferative enteropathy. *Vaccine*, *37*(10), 1340–1349.  
<https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2019.01.029>
- Nelson, G., Marconi, P., Periolo, O., La Torre, J., & Alvarez, M. A. (2012). Immunocompetent truncated E2 glycoprotein of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) expressed in *Nicotiana tabacum* plants: A candidate antigen for new generation of veterinary vaccines. *Vaccine*, *30*(30), 4499–4504. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.04.068>
- Norrman, K., Fischer, Y., Bonnamy, B., Sand, F. W., Ravassard, P., & Semb, H. (2010). Quantitative Comparison of Constitutive Promoters in Human ES cells. *PLoS ONE*, *5*(8).  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0012413>
- Nugroho, W., Silitonga, R. J. P., Reichel, M. P., Irianingsih, S. H., & Wicaksono, M. S. (2022). The Epidemiology and Control of Bovine Viral Diarrhoea Virus in Tropical Indonesian Cattle. *Pathogens*, *11*(2). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS11020215>
- Oğuzoğlu, T. Ç., Koç, B. T., Coşkun, N., Doğan, F., & Duran-Yelken, S. (2019). Endless variety for bovine virus diarrhoea viruses: new members of a novel subgroup into Pestivirus A from Turkey. *Tropical Animal Health and Production*, *51*(5), 1083–1087.  
<https://doi.org/10.1007/S11250-018-01787-W>
- Pande, A., Carr, B. V., Wong, S. Y. C., Dalton, K., Jones, I. M., McCauley, J. W., & Charleston, B. (2005). The glycosylation pattern of baculovirus expressed envelope protein E2 affects its ability to prevent infection with bovine viral diarrhoea virus. *Virus Research*, *114*(1–2), 54–62. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2005.05.011>

- Patterson, R., Nerren, J., Kogut, M., Court, P., Villarreal-Ramos, B., Seyfert, H. M., Dalby, P., & Werling, D. (2012). Yeast-surface expressed BVDV E2 protein induces a Th1/Th2 response in naïve T cells. *Developmental & Comparative Immunology*, *37*(1), 107–114. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2011.10.009>
- Pecora, A., Malacari, D. A., Perez Aguirreburualde, M. S., Bellido, D., Nuñez, M. C., Dus Santos, M. J., Escribano, J. M., & Wigdorovitz, A. (2015). Development of an APC-targeted multivalent E2-based vaccine against Bovine Viral Diarrhea Virus types 1 and 2. *Vaccine*, *33*(39), 5163–5171. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.07.106>
- Peddireddi, L., Foster, K. A., Poulsen, E. G., An, B., Hoang, Q. H., O'Connell, C., Anderson, J. W., Thomson, D. U., Hanzlicek, G. A., Bai, J., Hesse, R. A., Oberst, R. D., Anderson, G. A., & Leyva-Baca, I. (2018). Molecular detection and characterization of transient bovine viral diarrhea virus (BVDV) infections in cattle commingled with ten BVDV persistently infected cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, *30*(3), 413. <https://doi.org/10.1177/1040638717753962>
- Pereira, S., Kildegaard, H. F., & Andersen, M. R. (2018). Impact of CHO Metabolism on Cell Growth and Protein Production: An Overview of Toxic and Inhibiting Metabolites and Nutrients. *Biotechnology Journal*, *13*(3), 1700499. <https://doi.org/10.1002/BIOT.201700499>
- Peterhans, E., Jungi, T. W., & Schweizer, M. (2003a). BVDV and innate immunity. *Biologicals*, *31*(2), 107–112. [https://doi.org/10.1016/S1045-1056\(03\)00024-1](https://doi.org/10.1016/S1045-1056(03)00024-1)
- Peterhans, E., Jungi, T. W., & Schweizer, M. (2003b). BVDV and innate immunity. *Biologicals*, *31*(2), 107–112. [https://doi.org/10.1016/S1045-1056\(03\)00024-1](https://doi.org/10.1016/S1045-1056(03)00024-1)

- Pollet, J., Chen, W. H., & Strych, U. (2021). Recombinant protein vaccines, a proven approach against coronavirus pandemics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 170, 71.  
<https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2021.01.001>
- Radtke, C., & Tews, B. A. (2017). Retention and topology of the bovine viral diarrhea virus glycoprotein E2. *Journal of General Virology*, 98(10), 2482–2494.  
<https://doi.org/10.1099/jgv.0.000912>
- Ridpath, J. F. (2013). Immunology of BVDV vaccines. *Biologicals*, 41(1), 14–19.  
<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.07.003>
- Riedel, C., Chen, H. W., Reichart, U., Lamp, B., Laketa, V., & Rümenapf, T. (2020). Real Time Analysis of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Infection and Its Dependence on Bovine CD46. *Viruses*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/V12010116>
- Riley, J. M., Peel, D. S., Raper, K. C., & Hurt, C. (2019). INVITED REVIEW: Economic consequences of beef cow-calf disease mismanagement: Bovine viral diarrhea virus. In *Applied Animal Science* (Vol. 35, Issue 6, pp. 606–614). Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.15232/aas.2019-01861>
- Rodrigues, M. E., Costa, A. R., Henriques, M., Cunnah, P., Melton, D. W., Azeredo, J., & Oliveira, R. (2013). Advances and drawbacks of the adaptation to serum-free culture of CHO-K1 cells for monoclonal antibody production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169(4), 1279–1291. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-0068-z>
- Rosini, E., & Pollegioni, L. (2022). Optimized rapid production of recombinant secreted proteins in CHO cells grown in suspension: The case of RBD. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. <https://doi.org/10.1002/BAB.2409>

- Saliki, J. T., & Dubovi, E. J. (2004). Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 20, Issue 1, pp. 69–83). <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2003.11.005>
- Sánchez, O., Barrera, M., Rodríguez, M. P., Frías, M. T., Figueroa, N. E., Naranjo, P., Montesino, R., Farnos, O., Castell, S., Venereo, A., Ganges, L., Borroto, C., & Toledo, J. R. (2008). Classical swine fever virus E2 glycoprotein antigen produced in adenovirally transduced PK-15 cells confers complete protection in pigs upon viral challenge. *Vaccine*, *26*(7), 988–997. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2007.11.014>
- Schweizer, M., Stalder, H., Haslebacher, A., Grisiger, M., Schwermer, H., & Di Labio, E. (2021). Eradication of Bovine Viral Diarrhoea (BVD) in Cattle in Switzerland: Lessons Taught by the Complex Biology of the Virus. *Frontiers in Veterinary Science*, *8*. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2021.702730/FULL>
- Smith, D. B., Meyers, G., Bukh, J., Gould, E. A., Monath, T., Muerhoff, A. S., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Stapleton, J. T., Simmonds, P., & Becher, P. (2017). Proposed revision to the taxonomy of the genus Pestivirus, family Flaviviridae. *The Journal of General Virology*, *98*(8), 2106–2112. <https://doi.org/10.1099/JGV.0.000873>
- Spetter, M. J., Louge Uriarte, E. L., Armendano, J. I., Álvarez, I., Norero, N. S., Storani, L., Pereyra, S. B., Verna, A. E., Odeón, A. C., & González Altamiranda, E. A. (2021). Frequency of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in Argentinean bovine herds and comparison of diagnostic tests for BVDV detection in bovine serum samples: a preliminary study. *Brazilian Journal of Microbiology*, *52*(1), 467. <https://doi.org/10.1007/S42770-020-00410-1>

- Swiech, K., De Freitas, M. C. C., Covas, D. T., & Picanço-Castro, V. (2015). Recombinant glycoprotein production in human cell lines. *Methods in Molecular Biology*, 1258, 223–240. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5_12)
- Tautz, N., Tews, B. A., & Meyers, G. (2015). The Molecular Biology of Pestiviruses. In *Advances in Virus Research* (Vol. 93, pp. 47–160). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2015.03.002>
- Tejwani, V., Andersen, M. R., Nam, J. H., & Sharfstein, S. T. (2018). Glycoengineering in CHO Cells: Advances in Systems Biology. *Biotechnology Journal*, 13(3), 1700234. <https://doi.org/10.1002/BIOT.201700234>
- ThermoFisher. (n.d.). *Adherent Cell Culture vs. Suspension Cell Culture*.
- Thomas, C., Young, N. J., Heaney, J., Collins, M. E., & Brownlie, J. (2009). Evaluation of efficacy of mammalian and baculovirus expressed E2 subunit vaccine candidates to bovine viral diarrhoea virus. *Vaccine*, 27(17), 2387–2393. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.02.010>
- Tihanyi, B., & Nyitray, L. (2020). Recent advances in CHO cell line development for recombinant protein production. *Drug Discovery Today: Technologies*, 38, 25–34. <https://doi.org/10.1016/J.DDTEC.2021.02.003>
- Tripathi, N. K., & Shrivastava, A. (2019). Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 420. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2019.00420>
- Ugochukwu, A. I., Phillips, P. W. B., & Ochieng', B. J. (2020). Driving Adoption and Commercialization of Subunit Vaccines for Bovine Tuberculosis and Johne's Disease:

Policy Choices and Implications for Food Security. *Vaccines*, 8(4), 1–18.

<https://doi.org/10.3390/VACCINES8040667>

Vargas, D. S., Jaime, J., Víctor, ;, & Vera, J. (2009). *Perspectivas para el control del Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV) α Perspectives to control Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Perspectivas para o controle do vírus da diarreia viral Bovina (BVDV)*.

<http://rccp.udea.edu.co>

Walther, C. G., Whitfield, R., & James, D. C. (2016). Importance of Interaction between Integrin and Actin Cytoskeleton in Suspension Adaptation of CHO cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 178(7), 1286. <https://doi.org/10.1007/S12010-015-1945-Z>

Walz, P. H., Riddell, K. P., Newcomer, B. W., Neill, J. D., Falkenberg, S. M., Cortese, V. S., Scruggs, D. W., & Short, T. H. (2018). Comparison of reproductive protection against bovine viral diarrhea virus provided by multivalent viral vaccines containing inactivated fractions of bovine viral diarrhea virus 1 and 2. *Vaccine*, 36(26), 3853–3860.

<https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2018.04.005>

Wang, M., Jiang, S., & Wang, Y. (2016). Recent advances in the production of recombinant subunit vaccines in *Pichia pastoris*. *Bioengineered*, 7(3), 155.

<https://doi.org/10.1080/21655979.2016.1191707>

Wegelt, A., Reimann, I., Zemke, J., & Beer, M. (2009). New insights into processing of bovine viral diarrhea virus glycoproteins Erns and E1. *Journal of General Virology*, 90(10), 2462–2467. <https://doi.org/10.1099/vir.0.012559-0>

Wu, S., Rish, A. J., Skomo, A., Zhao, Y., Drennen, J. K., & Anderson, C. A. (2021). Rapid serum-free/suspension adaptation: Medium development using a definitive screening design for Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology Progress*, 37(4).

<https://doi.org/10.1002/btpr.3154>

Yeşilbağ, K., Alpay, G., & Becher, P. (2017). Variability and Global Distribution of Subgenotypes of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Viruses*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/V9060128>

Zhang, K., Zhang, J., Qiu, Z., Zhang, K., Liang, F., Zhou, Q., Wang, L., & Li, J. (2022). Prevalence characteristic of BVDV in some large scale dairy farms in Western China. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2022.961337/FULL>