



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Desarrollo y modificación de nanoanticuerpos aplicables al diagnóstico e inhibición de infecciones virales

Tesis presentada para optar por el título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires
en el área de Química Biológica

Lic. María Florencia Pavan

Directora de tesis: Dra. Lorena Itatí Ibañez

Directora adjunta: Dra. Cybele Carina García

Consejera de estudios: Dra. Claudia Soledad Sepúlveda

Lugar de trabajo: Instituto de Química, Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (IQUIMAE), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, diciembre de 2024

RESUMEN

Las enfermedades infecciosas estacionarias, emergentes o reemergentes están definidas como aquellas que se manifiestan de manera regular en determinadas épocas del año, aparecen por primera vez en una población o que, habiendo sido controladas previamente, vuelven a surgir. Los virus, particularmente los de ARN simple cadena, suelen ser los principales responsables de estas enfermedades, representando una amenaza global para la salud pública, la economía y la sociedad. En este contexto, los nanoanticuerpos (Nbs), derivados de los anticuerpos de cadena pesada presentes en los camélidos, han surgido como herramientas prometedoras para el diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades, debido a su alta afinidad, estabilidad y capacidad para ser fácilmente modificados.

Este trabajo de tesis abordó la generación, caracterización y modificación de Nbs contra tres virus claves vinculados con enfermedades infecciosas estacionarias, emergentes o reemergentes. El primer capítulo se dedicó a la caracterización de Nbs dirigidos contra el virus de influenza A, un virus ARN de simple cadena que causa infecciones respiratorias en humanos y animales. Este capítulo tuvo como objetivo la generación de Nbs de amplio espectro capaces de inhibir la infección por influenza. Aunque no fue posible demostrar la actividad antiviral, los Nbs generados poseen un alto potencial como herramientas diagnósticas para futuros brotes de influenza A, ya que logran reconocer diferentes subtipos del virus. El segundo capítulo se centró en el desarrollo de Nbs terapéuticos contra el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo de tipo 2 (SARS-CoV-2), un virus de ARN simple cadena responsable de la pandemia de COVID-19, que ejemplifica una enfermedad emergente que tuvo un impacto sin precedentes. En este trabajo se identificó un Nb con potente actividad neutralizante, eficaz no solo contra la variante original del virus, sino también contra diversas variantes emergentes. Finalmente, el tercer capítulo trató la caracterización y modificación de Nbs dirigidos contra la proteína no estructural 1 (NS1) del virus del dengue (DENV), una molécula que se libera al torrente sanguíneo en los primeros días de la infección y actúa como un marcador temprano de la infección viral. El objetivo fue desarrollar un ensayo diagnóstico rápido y sensible para la detección temprana del dengue, una enfermedad viral reemergente que sigue representando un desafío para la salud pública en regiones endémicas. Se generaron dos sistemas de detección basados en Nbs que permitieron detectar a la proteína NS1 recombinante de los 4 serotipos de DENV en una matriz de suero. Otro sistema desarrollado, que combinó la utilización de IgG de conejo purificada y Nbs, también permitió detectar la presencia de NS1 en muestras de pacientes infectados.

En conclusión, este trabajo de tesis demuestra la versatilidad y el potencial de los Nbs como herramientas para abordar el diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas estacionarias, emergentes y reemergentes.

Palabras Clave: Nanoanticuerpos; Influenza; SARS-CoV-2; Dengue; Diagnóstico; Tratamiento; Enfermedades Infecciosas.

Development and modification of nanobodies for the diagnosis and treatment of viral infections

ABSTRACT

Seasonal, emerging, and re-emerging infectious diseases are defined as those that manifest regularly during specific times of the year, appear for the first time in a population or reappear after previously being controlled. Viruses, particularly single-stranded RNA viruses, are often the primary drivers of these diseases, posing a significant global threat to public health, the economy and society. In this context, single domain antibodies or nanobodies (Nbs), derived from camelid heavy-chain antibodies, have emerged as promising tools for the diagnosis and treatment of these diseases due to their high affinity, stability, and ease of modification.

This thesis addressed the generation, characterization, and modification of Nbs against three key viruses associated with seasonal, emerging, or re-emerging infectious diseases. The first chapter focused on the characterization of Nbs targeting the influenza virus, a single-stranded RNA virus that causes respiratory infections in humans and animals. The goal of this work was to generate broad-spectrum Nbs capable of inhibiting influenza infection. Although antiviral activity could not be demonstrated, the Nbs generated have significant potential as diagnostic tools for future influenza A outbreaks, given their ability to recognize different viral subtypes. The second chapter centered on the development of therapeutic Nbs against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), a single stranded RNA virus responsible for the COVID-19 pandemic, an emerging disease with an unprecedented impact. In this study, a Nb with potent neutralizing activity was identified, effective not only against the original virus strain but also against various emerging variants. Finally, the third chapter addressed the characterization and modification of Nbs targeting the non-structural protein 1 (NS1) of dengue virus (DENV), a molecule released into the bloodstream early in infection. The aim was to develop a rapid and sensitive diagnostic assay for early dengue detection, a re-emerging viral disease that continues to pose a public health challenge in endemic regions. Two Nb-based detection systems were developed, enabling the detection of recombinant NS1 protein from the 4 DENV serotypes in a serum matrix. Another system, which combined purified rabbit IgG and Nbs, also allowed the detection of NS1 in samples from infected patients.

In conclusion, this thesis demonstrates the versatility and potential of Nbs as tools for diagnosing and treating seasonal, emerging and re-emerging infectious diseases.

Keywords: Nanobodies, Influenza, SARS-CoV-2, Dengue, Diagnosis, Treatment, Emerging and Re-emerging Infectious Diseases.

“Los científicos damos por sentado que el error existe, razón por la cual aceptamos el fracaso”

Lecciones de química – Bonnie Garmus

PUBLICACIONES

Los resultados presentados en el capítulo 3 dieron origen a las siguientes publicaciones:

1. SARS-CoV-2 Specific Nanobodies Neutralize Different Variants of Concern and Reduce Virus Load in the Brain of h-ACE2 Transgenic Mice. **Pavan MF**, Bok M, Betanzos San Juan R, Malito JP, Marcoppido GA, Franco DR, Militelo DA, Schammas JM, Bari SE, Stone W, López K, Porier DL, Muller JA, Auguste AJ, Yuan L, Wigdorovitz A, Parreño VG, Ibañez LI. *Viruses*. 2024 Jan 25;16(2):185. doi: 10.3390/v16020185. PMID: 38399961; PMCID: PMC10892724.
2. Development of Nanobody-Displayed Whole-Cell Biosensors for the Colorimetric Detection of SARS-CoV-2. He Y, Xu Z, Kasputis T, Zhao X, Ibañez I, **Pavan MF**, Bok M, Malito JP, Parreno V, Yuan L, Wright RC, Chen J. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2023 Aug 9;15(31):37184-37192. doi: 10.1021/acsami.3c05900. Epub 2023 Jul 25. PMID: 37489943; PMCID: PMC11216949.

Los resultados presentados en el capítulo 4 están siendo preparados para su próxima publicación.

Las siguientes publicaciones fueron generadas mediante colaboraciones realizadas durante el desarrollo de la tesis:

1. Deglycosylated RBD produced in *Pichia pastoris* as a low-cost sera COVID-19 diagnosis tool and a vaccine candidate. Idrovo-Hidalgo T, Pignataro MF, Bredeston LM, Elias F, Herrera MG, **Pavan MF**, Foscaldi S, Suirezcz M, Fernández NB, Wetzler DE, Paván CH, Craig PO, Roman EA, Ruberto LAM, Nosedá DG, Ibañez LI, Czibener C; Argentinian AntiCovid Consortium; Ugalde JE, Nadra AD, Santos J, D'Alessio C. *Glycobiology*. 2024 Mar 19;34(1):cwad089. doi: 10.1093/glycob/cwad089. PMID: 37944064.
2. CRISPR/Cas9-based edition of frataxin gene in *Dictyostelium discoideum*. Gentili HG, Pignataro MF, Olmos J, **Pavan MF**, Ibañez LI, Santos J, Velazquez Duarte F. *Biochem J*. 2023 Oct 11;480(19):1533-1551. doi: 10.1042/BCJ20230244. PMID: 37721041.
3. A multispecies competitive nanobody-based ELISA for the detection of antibodies against hepatitis E virus. Arce LP, **Pavan MF**, Bok M, Gutiérrez SE, Estein SM, Santos AT, Condorí WE, Uhart MM, Parreño V, Vizoso-Pinto MG, Ibañez LI. *Sci Rep*. 2023 Sep 18;13(1):15448. doi: 10.1038/s41598-023-41955-z. PMID: 37723180; PMCID: PMC10507121.
4. Covalent coupling of Spike's receptor binding domain to a multimeric carrier produces a high immune response against SARS-CoV-2. Argentinian AntiCovid Consortium. *Sci Rep*. 2022 Jan 13;12(1):692. doi: 10.1038/s41598-021-03675-0. Erratum in: *Sci Rep*. 2022 Jan 25;12(1):1645. doi: 10.1038/s41598-022-05984-4. PMID: 35027583; PMCID: PMC8758758.
5. Structural and functional comparison of SARS-CoV-2-spike receptor binding domain produced in *Pichia pastoris* and mammalian cells. Argentinian AntiCovid Consortium. *Sci Rep*. 2020 Dec 11;10(1):21779. doi: 10.1038/s41598-020-78711-6. PMID: 33311634; PMCID: PMC7732851.

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de estos 6 años, muchas personas han sido fundamentales para completar mis estudios doctorales, y quiero dedicar estas palabras a quienes me acompañaron y apoyaron incondicionalmente.

En primer lugar, quiero agradecer a Gonza, mi compañero de vida. Gracias por tu escucha atenta de todos los días, por tus palabras de aliento en los momentos difíciles, y por compartir mi alegría en cada logro alcanzado.

A mi mamá, mi ejemplo de lucha y fortaleza. Gracias por estar incondicionalmente y apoyarme en cada decisión que tomo. Gracias por tantas charlas en donde te interesabas por conocer de mi proyecto y brindarme consejos. Estoy segura de que papá estaría orgulloso de mí por todo el camino recorrido. Mi gratitud también va para él; aunque no esté más físicamente, tengo la certeza de que me guió desde el cielo. Gracias a mis hermanos Mati, Agos y Martu. La vida es mucho más divertida con ustedes.

A mis amigas de siempre: Juli, Cami, Abi, Mechi, Cami, Jose y Romi. Gracias por tantos años de amistad compartidos, por sus palabras de aliento en estas últimas semanas y por estar siempre presentes, incluso algunas a la distancia.

Mi gratitud también está dirigida a los amigos que el doctorado me regaló: Emi, Dani, Tommy, Flor, Mica, Joaco, Cris y Yes. De compañeros pasaron a ser confidentes, y juntos hicieron del laboratorio un lugar al que cada día disfrutaba regresar. Nunca faltaron las risas, las comidas y viajes compartidos y, sobre todo, el apoyo mutuo en cada etapa del camino.

A mis directoras de tesis, Itatí y Cybele, mi más sincero agradecimiento por su confianza en mí, por guiarme con sabiduría, y por su ejemplo de dedicación y vocación por la ciencia. Itatí, tu pasión por la investigación fue una fuente de inspiración. Gracias por recordarme que cada desafío es una oportunidad para crecer y mejorar. Cybele, tu apoyo y tu capacidad para impulsarme a dar lo mejor de mí fueron fundamentales en este camino. Siempre encontraste el momento para ofrecerme consejos acertados y brindarme una perspectiva clara y motivadora.

A la UBA y CONICET, por proporcionar las herramientas y el financiamiento para seguir formándome como profesional. A la Dra. Claudia Filomatori, la Dra. Mariana Del Vas y al Dr. Oscar Taboga, por aceptar ser jurado de esta tesis. A la Dra. Claudia Sepúlveda por su guía como consejera de estudios. A la Dra. Viviana Parreño, por siempre atender mis dudas y por toda la ayuda estadística que recibí estos años.

Finalmente, al Dr. Patricio Craig y al Dr. Diego Álvarez, miembros del comité de seguimiento de tesis, por sus valiosos consejos que enriquecieron enormemente este trabajo.

A todos ustedes, mi más profundo agradecimiento por ser parte de este viaje.

ÍNDICE

Capítulo 1: Introducción	13
1. Contexto y motivación del estudio	14
1.1. Impacto de las infecciones virales estacionarias, emergentes y reemergentes	14
2. Nanoanticuerpos	15
2.1. Origen, estructura y propiedades de los Nbs	15
2.2. Metodología de producción de Nbs	18
2.3. Modificación y funcionalización de Nbs	19
2.3.1. Modificación genética	19
2.3.2. Modificación química	20
2.3.3. Modificación enzimática	22
2.4. Aplicaciones de los Nbs en virología	22
2.2.1. Herramientas moleculares	22
2.2.2. Aplicaciones diagnósticas	23
2.2.3. Aplicaciones terapéuticas	24
3. Consideraciones finales y estructura de la tesis	26
Capítulo 2: Caracterización de Nbs anti-HA para el tratamiento o diagnóstico de la infección por IAV.	28
1. Introducción	29
1.1. Estructura del virus de influenza A	29
1.2. Ciclo de replicación del virus de influenza A	31
1.3. Prevención y tratamiento de la infección	33
1.4. Influenza y zoonosis	34
2. Objetivos	35
3. Antecedentes	36
4. Resultados	37
4.1. Expresión y purificación de proteínas recombinantes	37
4.1.1. Expresión y purificación de Nbs bivalentes	37
4.1.2. Expresión y purificación de Nbs Fc	38
4.2. Estudio de la capacidad neutralizante e inhibitoria de las moléculas generadas	39
4.2.1. Ensayo acelerado de inhibición viral con lectura de NA (AVINA)	39
4.2.2. Ensayo de microneutralización	40
4.2.3. Estudio de la inhibición de la hemólisis de glóbulos rojos	41
5. Discusión	41
Capítulo 3: Desarrollo de Nbs capaces de neutralizar la infección causada por el SARS-CoV-2	44
1. Introducción	45
1.1. Estructura del SARS-CoV-2	45
1.2. Ciclo de replicación del SARS-CoV-2	46
1.3. Epidemiología del SARS-CoV-2	48
1.4. Presentación clínica	50
1.5. Tratamiento de la infección	51
2. Objetivos	53
3. Resultados	54

3.1. Producción y purificación de las proteínas recombinantes S y la subunidad RBD de SARS-CoV-2	54
3.2. Inmunización y evaluación de la respuesta inmune	55
3.3. Construcción de la biblioteca de Nbs	56
3.4. Selección de Nbs específicos para SARS-CoV-2 S-2P y RBD	58
3.5. Caracterización in vitro de los Nbs	59
3.5.1. Análisis filogenético de las secuencias de Nbs	59
3.5.2. Expresión y purificación de los Nbs	61
3.5.3. Análisis de la capacidad neutralizante de los Nbs seleccionados	62
3.5.4. Estudio de la afinidad relativa y especificidad de los Nbs	64
3.5.5. Estudios de competencia de los Nbs seleccionados	64
3.5.6. Estudio de la capacidad neutralizante de los Nbs seleccionados frente a las variantes de SARS-CoV-2	66
3.5.7. Análisis del rol de la mutación L452R de la variante Delta en la capacidad neutralizante de los Nbs	67
3.5.8. Estudio de la potencia neutralizante de cócteles de Nbs	68
3.6. Mapeo de epítopes y predicción in silico del modo de unión	70
4. Discusión	74
Capítulo 4: Modificación de Nbs para la detección de la proteína NS1 de dengue	81
1. Introducción	82
1.1. Estructura del virus del dengue	82
1.2. Ciclo de replicación del virus del dengue	84
1.3. Epidemiología del dengue	86
1.4. Presentación clínica	88
1.5. Diagnóstico de la infección	89
2. Objetivos	91
3. Antecedentes	91
4. Resultados	92
4.1. Producción y purificación de las proteínas recombinantes NS1 de los 4 serotipos de DENV	92
4.1.1. Subclonado de secuencias codificantes para la proteína NS1 de los 4 serotipos de DENV en el vector pFUSEss para mejorar la expresión de las proteínas	93
4.1.2. Comparación de los niveles de expresión en ambos vectores	94
4.1.3. Análisis de las proteínas recombinantes de ambos vectores mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC-HPLC)	96
4.2. Caracterización de los Nbs	96
4.2.1. Análisis filogenético de las secuencias de Nbs	96
4.2.2. Determinación de la afinidad de los Nbs seleccionados	98
4.3. Modificación de los Nbs para mejorar su capacidad como anticuerpos de captura	100
4.3.1. Subclonado, expresión y purificación de Nbs con secuencia de pegado a plástico (Nbs-PSW)	101
4.3.2. Subclonado, expresión y purificación de Nbs bivalentes	101
4.3.3. Subclonado, expresión y purificación de Nbs acoplados a la región Fc de las inmunoglobulinas de ratón	103
4.4. Modificación de los Nbs para mejorar su capacidad como anticuerpos de detección	104
4.4.1. Subclonado, expresión y purificación de Nbs biotinilados	104

4.4.2. Subclonado, expresión y purificación de Nbs acoplados a la región Fc de las inmunoglobulinas de ratón y HRP _____	107
4.5. Desarrollo de un ELISA sándwich basado en Nbs para detectar la proteína NS1 de dengue _____	109
4.5.1. Determinación de las condiciones óptimas de la captura de NS1 recombinante _____	109
4.5.2. Comparación de la capacidad de captura de NS1 recombinante de las diferentes moléculas generadas _____	111
4.5.3. Optimización del ensayo mediante titulación en tablero de ajedrez o diluciones en serie en 2 dimensiones _____	113
4.5.4. Estudio de la capacidad de detección de las proteínas NS1 recombinantes y sueros positivos y negativos en los dos sistemas propuestos _____	115
4.6. Desarrollo de un ELISA sándwich combinado para detectar la proteína NS1 de dengue _____	117
4.6.1. Inmunización de un conejo para la generación de un suero policlonal anti-NS1 de DENV _____	117
4.6.2. Optimización del ensayo diagnóstico y estudio de la capacidad de detección de las proteínas NS1 recombinantes y sueros positivos y negativos _____	118
4.6.3. Validación del ELISA sándwich combinado _____	120
4.6.4. Evaluación de la sensibilidad analítica del ELISA sándwich combinado _____	121
5. Discusión _____	121
Capítulo 5: Conclusiones Generales _____	130
1. Conclusiones generales _____	131
Capítulo 6: Materiales y métodos _____	133
1. Materiales _____	134
1.1. Líneas celulares _____	134
1.2. Cepas virales _____	134
1.3. Cepas bacterianas _____	134
1.4. Reactivos e insumos de laboratorio _____	135
1.5. Marcadores de peso molecular _____	137
1.6. Soluciones y medios de cultivo _____	137
1.7. Sueros de pacientes _____	138
2. Métodos _____	139
2.1. Técnicas generales de biología molecular _____	139
2.2. Técnicas de bioquímica de proteínas _____	144
2.3. Técnicas de biología celular _____	146
2.4. Producción de Nbs _____	150
2.5. Expresión y purificación de proteínas _____	158
2.6. Caracterización de Nbs _____	160
2.7. Técnicas bioinformáticas _____	164
2.8. Desarrollo de un ELISA sándwich para la detección de la proteína NS1 _____	166
Bibliografía _____	171

ABREVIATURAS Y TRADUCCIONES

AA	Aminoácido
ACE2	Enzima convertidora de la angiotensina 2 (<i>Angiotensin-Converting Enzyme</i>)
ARNv	ARN viral
AVINA	Ensayo acelerado de inhibición viral con lectura de NA (<i>Accelerated Virus Inhibition Assay with NA as read-out</i>)
BCoV	Coronavirus bovino (<i>Bovine Coronavirus</i>)
BirA	Biotin ligasa A (<i>Biotin ligase A</i>)
BSA	Seroalbúmina bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
C	Proteína de la cápside de DENV
CDRs	Regiones determinantes de complementariedad (<i>Complementarity-Determining Region</i>)
CH	Dominio constante de la cadena pesada de una inmunoglobulina
CHKV	Chikungunya virus
CL	Dominio constante de la cadena liviana de una inmunoglobulina
COVID-19	Enfermedad por coronavirus 2019 (<i>Coronavirus Disease</i>)
DENV	Virus del dengue (<i>Dengue virus</i>)
DF	Enfermedad o fiebre del dengue (<i>Dengue fever</i>)
E	Glicoproteína de la envoltura
EC₅₀	Concentración efectiva media (<i>Half maximal effective concentration</i>)
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
FGE	Enzima generadora de formilglicina (<i>Formylglycine-generating enzyme</i>)
FR	Región marco (<i>Framework Region</i>)
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GISRS	Sistema de Respuesta y Vigilancia de Influenza a Nivel Mundial (<i>Global Influenza Surveillance and Response System</i>)
HA	Hemaglutinina
HPAIV	Virus de influenza aviar altamente patógeno (<i>Highly Pathogenic Avian Influenza Virus</i>)
HR	Secuencias repetidas heptapeptídicas (<i>Heptad Repeat Sequences</i>)
HRP	Peroxidasa de rábano picante (<i>Horseradish peroxidase</i>)
IAV	Virus de influenza A (<i>Influenza A virus</i>)
IC₅₀	Concentración inhibitoria media (<i>Half-maximal inhibitory concentration</i>)
IF	Inmunofluorescencia
IgG	Inmunoglobulina tipo G
IL-2	Interleuquina 2
IMAC	Cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>)
kb	Kilobases
mAb	Anticuerpo monoclonal (<i>Monoclonal antibody</i>)
MN	Ensayo de microneutralización (<i>Microneutralization Assay</i>)

NA	Neuraminidasa
Nb	Nanoanticuerpo (<i>Nanobody</i>)
NP	Nucleoproteína
NS1	Proteína no estructural 1 (<i>Non-structural protein 1</i>)
nsp	Proteínas no estructurales (<i>Non-structural proteins</i>)
NTD	Dominio N-terminal (<i>N-terminal domain</i>)
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Marco de lectura abierto (<i>Open Reading Frame</i>)
PAL	Fosfatasa alcalina
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEG	Polietilenglicol
PEI	Polietilenimina
peIB	Secuencia de secreción periplásmica
PID	Día post inmunización (<i>Post-immunization Day</i>)
PM	Peso molecular
prM	Proteína de pre-membrana de DENV
PRNT	Ensayo de neutralización por reducción de placas (<i>Plaque Reduction Neutralization Test</i>)
pVNT	Ensayo de neutralización utilizando pseudovirus (<i>Pseudovirus Neutralization Test</i>)
RBD	Dominio de unión al receptor (<i>Receptor Binding Domain</i>)
RBM	Motivo de unión al receptor (<i>Receptor Binding Motif</i>)
RDTs	Pruebas de diagnóstico rápido (<i>Rapid Diagnostic Tests</i>)
RE	Reticulo endoplásmico
Región Fc	Fragmento cristizable (<i>Fragment Crystallizable Region</i>)
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (<i>Restriction Fragments Length Polymorphism</i>)
RNP	Ribonucleoproteínas
RSV	Virus sincicial respiratorio (<i>Respiratory Syncytial Virus</i>)
S	Proteína <i>Spike</i>
SARS-CoV-2	Coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo tipo 2 (<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>)
sdAb	Anticuerpo de dominio único (<i>Single domain antibody</i>)
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño (<i>Size Exclusion Chromatography</i>)
TMD	Región transmembrana (<i>Transmembrane Domain</i>)
TMPRSS2	Proteasa de serina transmembrana tipo II (<i>Transmembrane serine protease 2</i>)
UTR	Región no traducida (<i>Untranslated Region</i>)
VH	Región variable de la cadena pesada (<i>Heavy chain variable region</i>)
VL	Región variable de la cadena liviana (<i>Light chain variable region</i>)
VNA	Ensayo de neutralización viral (<i>Viral Neutralization Assay</i>)
VOC	Variante de preocupación (<i>Variant of Concern</i>)
ZIKV	Virus del Zika (<i>Zika virus</i>)

Capítulo 1: Introducción

1. Contexto y motivación del estudio

1.1. Impacto de las infecciones virales estacionarias, emergentes y reemergentes

Las enfermedades infecciosas estacionarias, emergentes o reemergentes incluyen a aquellas enfermedades causadas por virus que circulan anualmente, virus recién identificados, o virus ya conocidos que han adquirido nuevos factores de virulencia o que se han propagado a áreas que previamente no habían sido afectadas [1]. La incidencia de virus emergentes y reemergentes se ve influenciada por varios factores, que pueden estar asociados al aumento de la población humana, a la globalización, a la infraestructura de salud pública deficiente y al cambio climático [2]. En la última década, hemos sido testigos del persistente impacto de la influenza estacional en la salud pública, junto con la reemergencia de virus como el Zika (ZIKV), dengue (DENV), chikungunya (CHKV) e influenza aviar. Asimismo, la enfermedad por coronavirus (COVID-19) se ha identificado como una enfermedad causada por el nuevo coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2).

Los patógenos estacionales, emergentes y reemergentes representan una amenaza constante para la humanidad, no solo por las consecuencias para la salud pública, sino también por los efectos económicos, sociales y políticos que pueden provocar a nivel mundial [3]. Por ejemplo, los brotes del virus de influenza A (IAV) a lo largo de la historia han tenido un impacto significativo en la salud pública global. Las pandemias de los años 1918, 1957, 1968 y 2009 fueron responsables de millones de muertes y ejercieron una presión extrema sobre los sistemas de salud, aumentando la demanda de atención médica y disminuyendo el acceso a suministros médicos o a camas hospitalarias [4]. Por otro lado, los brotes de influenza aviar tienen un impacto significativo en la economía, particularmente en la industria alimenticia. La contaminación de una parvada, aunque sea mínima, puede llevar a la pérdida total de la misma, resultando en enormes pérdidas financieras para los productores avícolas [5]. Además, estos brotes pueden interrumpir la cadena de suministro, afectando la disponibilidad de productos avícolas como el pollo y los huevos y aumentando los precios de estos productos, y/o reducir las ventas debido al temor y pérdida de confianza de los consumidores [6]. Recientemente, se ha identificado un brote de influenza aviar H5N1 en ganado lechero en los Estados Unidos, acompañado de la detección de altos títulos del virus en la leche de las vacas infectadas, lo que representa una nueva preocupación para este tipo de industria [7], [8]. El virus se

propagó dentro de los rebaños, afectando también a aves de corral y humanos, representando una amenaza para la salud pública [9].

Las consecuencias de las enfermedades infecciosas emergentes pueden ser aún más devastadoras de lo que se ha descrito anteriormente. La pandemia de COVID-19 no solo tuvo un impacto directo en el número de enfermos y muertos, sino que también afectó profundamente múltiples aspectos socioeconómicos y estructurales de los países. En Argentina, esta crisis sanitaria aumentó significativamente los niveles de pobreza monetaria, con un incremento de un 6.5% durante el 2020 [10]. La situación del mercado laboral, que ya se encontraba en una situación de fragilidad, también se afectó por este hecho, generando reducción salarial, destrucción de empleos en distintos sectores y grupos poblacionales y una caída del 10% del producto bruto interno [11]. La aparición de este nuevo coronavirus y la declaración de la pandemia también exacerbaron las desigualdades en materia de acceso a la salud, educación y género.

La comprensión del impacto profundo y multifacético que tienen las enfermedades infecciosas emergentes o reemergentes subraya la importancia de desarrollar nuevas herramientas y estrategias para la detección y el tratamiento de estas infecciones, con el fin de mitigar sus efectos y fortalecer la capacidad de respuesta frente a futuros brotes.

2. Nanoanticuerpos

2.1. Origen, estructura y propiedades de los nanoanticuerpos

La creencia de que todos los anticuerpos estaban compuestos por dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas cambió en el año 1989, cuando se descubrió un nuevo tipo de anticuerpo presente en el suero de los dromedarios (*Camelus dromedarius*). Una investigación llevada a cabo por Hamers-Casterman *et al.* reportó que, además de los anticuerpos convencionales, el suero de estos animales contenía anticuerpos del tipo IgG2 e IgG3 carentes de cadenas livianas, a los que se los denominó anticuerpos de cadena pesada [12]. Años más tarde se observó que estos anticuerpos están presentes en toda la familia de los camélidos y, a su vez, en algunos peces cartilaginosos [13], [14].

A diferencia de los anticuerpos convencionales que están compuestos por dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas, los anticuerpos de cadena pesada están compuestos por un dominio variable unido a los dominios constantes CH2 y CH3 a través de la región bisagra (**Figura 1A**) [15]. Así, el dominio de unión de estos anticuerpos consiste en un

único dominio variable de aproximadamente 15 kDa, comúnmente denominado nanoanticuerpo, Nb (*nanobody*), sdAb (*single domain antibody*), VHH, entre otros [12], [16]. A pesar de su menor tamaño, los Nbs mantienen una afinidad y especificidad similar a la de los anticuerpos convencionales.

Los Nbs son similares a las regiones variables (V) convencionales tanto a nivel de secuencia como de estructura (**Figura 1B-E**) [17]. En particular, los Nbs poseen una elevada homología con la familia V_H3 humana, indicando que los mismos podrían tener una baja inmunogenicidad [18]. Sin embargo, existen una serie de diferencias importantes en las regiones hipervariables determinantes de complementariedad (CDRs) y en la región marco 2 (FR2) (**Figura 1B y 1D**). En los anticuerpos convencionales, los aminoácidos (AA) Val47, Gly49, Leu50 y Trp52 de la región FR2 forman una superficie hidrofóbica que es crítica para la interacción entre la región variable de la cadena pesada y de la cadena liviana (VH-VL); mientras que en los anticuerpos de cadena pesada estos residuos son reemplazados por AA más hidrofílicos (Phe42, Glu49, Arg50 y Gly52) ante la falta del dominio VL, proporcionando así mayor solubilidad y estabilidad a los Nbs expresados de manera recombinante [17], [19].

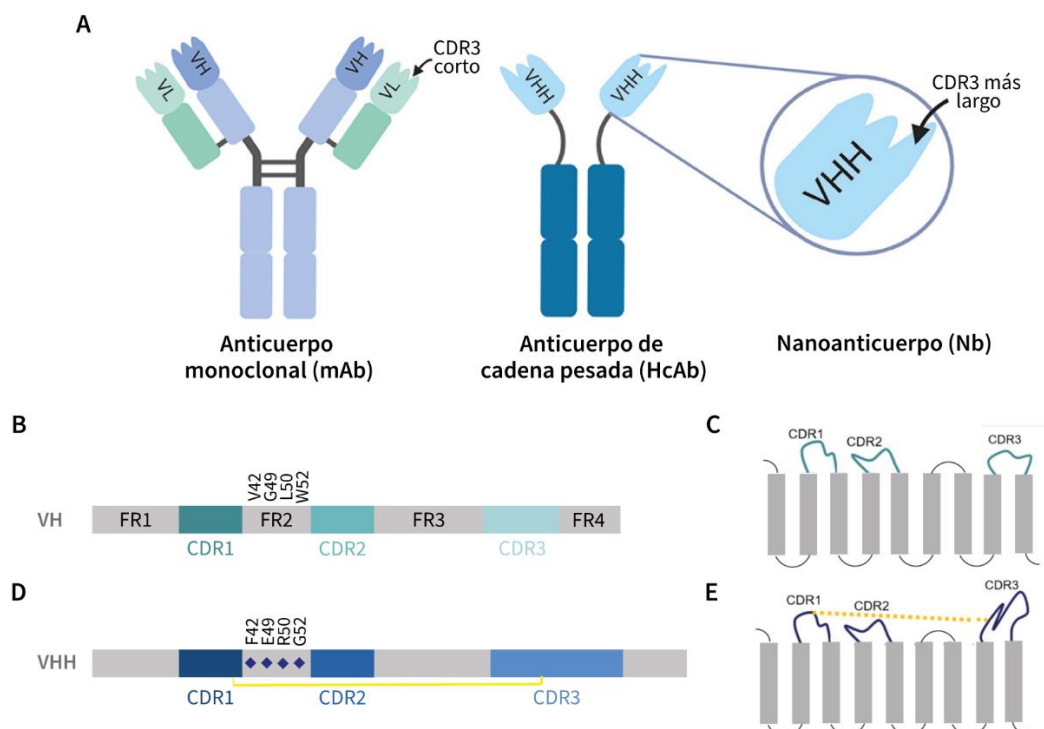


Figura 1. (A) Diagrama representativo de un anticuerpo convencional o monoclonal (mAb) compuesto por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, un anticuerpo de cadena pesada que carece de las cadenas ligeras y un nanoanticuerpo (Nb), que representa el dominio de unión al antígeno del anticuerpo de cadena pesada. (B) Organización de las CDRs y FRs en un dominio

VH. (C) Estructura secundaria de un dominio VH. (D) Organización de las CDRs y FRs de un dominio VHH, indicando el puente disulfuro presente en la molécula y las posiciones del FR2 que contienen aminoácidos hidrofílicos en comparación con el dominio VH donde predominan los residuos hidrofóbicos. (D) Estructura secundaria de un dominio VHH, mostrando el enlace disulfuro característico y la mayor longitud del CDR3. Figura modificada de Yang *et al.* y Flajnik *et al.* [20], [21].

Por otra parte, las regiones CDR3 de los Nbs son más extensas (13-17 AA) que las regiones CDR3 de los VHs humanos o de ratón (9-12 y 9-17 AA respectivamente) [22]. Esta característica le confiere a los Nbs una forma de elipsoide con paratopes convexos que les permite reconocer epítopes conformacionales o alcanzar sitios inaccesibles para el par VH-VL de los anticuerpos convencionales. Un claro ejemplo de las diferencias de interacción de Nbs y anticuerpos convencionales con una proteína blanco se puede observar en un trabajo realizado utilizando lisozima [23]. A su vez, las regiones CDR1 y CDR3 contienen una cisteína que permite la formación de un segundo puente disulfuro [17]. Este puente disulfuro estabiliza los bucles de los CDRs, reduciendo así su flexibilidad. Probablemente, esto también contribuya a la afinidad y la diversidad estructural del Nb [24]. Por último, estudios recientes han demostrado que el CDR3 domina la interacción del Nb con el antígeno, a diferencia de lo que ocurre en los anticuerpos convencionales en donde los tres CDRs contribuyen de manera considerable en dicha interacción [25]. A su vez, los paratopes de los Nbs se pueden construir a partir de muchas combinaciones diferentes de parches de superficie, incluyendo no sólo las regiones CDRs sino también los FRs [25], [26].

Los Nbs presentan una serie de ventajas en comparación a los anticuerpos convencionales. Entre sus características clave se encuentran una mayor solubilidad, excelente estabilidad y tolerancia a altas temperaturas o a condiciones de pH extremo, siendo así candidatos ideales para el desarrollo de terapias viables contra virus en ambientes hostiles, como el tracto respiratorio y gastrointestinal [27], [28]. Una de las mayores ventajas a nivel biotecnológico consiste en la capacidad de expresar eficientemente los Nbs en bacterias, como *Escherichia coli*, o levaduras a bajos costos y en cortos tiempos. A su vez, su naturaleza de dominio único facilita la manipulación molecular con el fin de transformar los Nbs monovalentes en formatos multivalentes para incrementar la avidéz de los mismos o producir Nbs bi-específicos que puedan reconocer simultáneamente diferentes antígenos [29]. Además, dado a su pequeño

tamaño (~15 kDa), los Nbs son capaces de penetrar rápidamente los tejidos, incluyendo la barrera hematoencefálica [30].

2.2. Metodología de producción de Nbs

El desarrollo de Nbs es un proceso complejo que abarca principalmente 3 etapas: la construcción de una biblioteca de Nbs, la selección de Nbs específicos y la validación de estas moléculas.

Los Nbs pueden derivar de bibliotecas inmunes construidas a partir de la inmunización de camélidos o tiburones, aunque en los últimos años también se han utilizado bibliotecas sintéticas para generar Nbs contra blancos no inmunogénicos y evitar el uso de animales [31]. La generación de una biblioteca inmune comienza con el diseño de la estrategia de inmunización, en donde se utiliza principalmente proteínas solubles como inmunógenos. Otras estrategias involucran el uso de ADN copia que codifica para la proteína de interés (cuando la proteína es difícil de expresar), ARN mensajero o mezclas complejas como virus enteros o extractos celulares/proteicos [32], [33].

Durante el proceso de inmunización, se pueden tomar pequeñas muestras de sangre para monitorear la respuesta inmune y la reactividad a los antígenos utilizando diversos métodos como ELISA, *dot-blot*, etc. Al finalizar la inmunización, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aíslan de la sangre anticoagulada, se extrae el ARN y se genera el ADN copia [34]. Las secuencias genéticas de los Nbs se amplifican mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se clonan en plásmidos adecuados para la selección de Nbs específicos.

La selección de Nbs específicos puede realizarse mediante diversas estrategias, siendo la metodología de *phage display* la más utilizada [35], [36]. Esta técnica se ha usado extensamente debido a su versatilidad, eficiencia y bajos costos [31], [37], [38]. Para este proceso, se construye una biblioteca de fagos, donde cada fago presenta un Nb diferente fusionado genéticamente en la proteína de superficie pIII del fago. La biblioteca de fagos se incuba con el antígeno de interés, que puede estar inmovilizado en una superficie sólida, y luego de varios lavados se eliminan los fagos no específicos. Los fagos que se unen al antígeno se aíslan, se amplifican y se someten a ciclos adicionales de selección para enriquecer la población de Nbs específicos. Otros métodos de selección de Nbs involucran *yeast display*, *mRNA/cDNA display*, *ribosome display* o secuenciación masiva de ADN [39], [40], [41], [42], [43].

Después del proceso de biopaneo, los Nbs específicos pueden ser identificados por varios métodos. El enfoque tradicional consiste en la selección manual de colonias individuales, seguida de la expresión de los Nbs a pequeña escala y la detección de la especificidad de estas moléculas mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) [34], [44]. La secuencia nucleotídica de estos ligandos se obtiene mediante secuenciación. Además, durante los últimos años se han desarrollado nuevas estrategias para el análisis de Nbs específicos como la secuenciación masiva de bibliotecas o la utilización de péptidos de codificación de barras que son detectados por espectrometría de masas [45]. Luego de la selección y validación de estos Nbs, los mismos son expresados y caracterizados en profundidad.

2.3. Modificación y funcionalización de Nbs

Los Nbs pueden ser modificados genética, química o enzimáticamente para mejorar sus propiedades y ampliar su rango de aplicaciones gracias a la naturaleza modular y monomérica de estas moléculas.

2.3.1. Modificación genética

La modificación genética incluye la fusión genética a diferentes moléculas para aplicaciones diagnósticas o terapéuticas y la humanización de los Nbs, con el fin de evitar posibles problemas de inmunogenicidad al ser administrados en humanos [31]. Esta última consiste en la mutación de las secuencias de aminoácidos específicas de camélidos en las regiones marco a su equivalente en el dominio variable de la cadena pesada humana [18].

Los Nbs son comúnmente fusionados de manera genética a etiquetas como 6xHis, c-myc, HA o FLAG para facilitar su purificación y detección (**Figura 2A**). Además, se puede fusionar la secuencia de los Nbs a la etiqueta “Avi” o “Avi-Tag” para la biotinylation de estas moléculas [46], [47]. Otras modificaciones consisten en la fusión de: (i) una proteína fluorescente para generar *chromobodies* y visualizar la dinámica y localización subcelular del antígeno/proteína en células vivas [48], [49]; (ii) un Nb terapéutico a proteínas de mayor peso molecular (PM), como la albumina sérica (BSA), para aumentar el tiempo de circulación en sangre [50]; (iii) dos Nbs a través de un *linker*, generando una construcción bivalente que mejora la afinidad funcional al antígeno [51], [52]; (iv) la secuencia codificante de la fosfatasa alcalina (PAL) o la peroxidasa de rábano picante (HRP) para

aplicaciones en ensayos de ELISA [53], [54]; y (v) el fragmento cristalizante (región Fc) para activar funciones efectoras inmunes naturales (**Figura 2**) [55], [56].

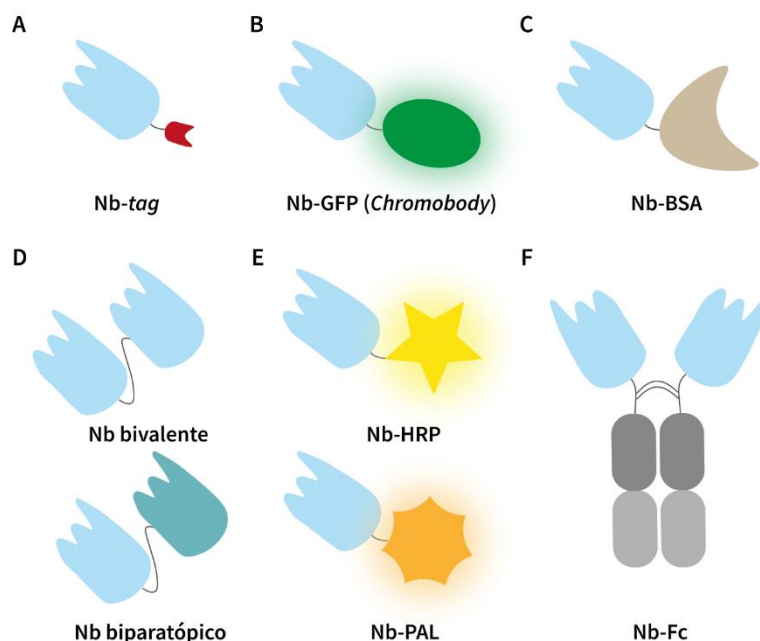


Figura 2. Modificaciones genéticas de los Nbs. (A) Un Nb fusionado a una etiqueta que permite su detección o purificación. (B) Un *chromobody*, es decir, un Nb fusionado genéticamente con una proteína fluorescente, como la proteína verde fluorescente (GFP), que permite la visualización de proteínas en células vivas o en preparados utilizando diferentes técnicas. (C) Un Nb conjugado a BSA, utilizado para aumentar la estabilidad o tiempo de vida media en sangre. (D) Fusión genética de Nbs que se unen al mismo epítipo (bivalente) o a dos epítopos diferentes (biparatópico) del mismo antígeno, mejorando afinidad y especificidad de unión. (E) Nanoanticuerpos conjugados a enzimas como la HRP o PAL para aplicaciones diagnósticas. (F) Fusión genética de un Nb con la región Fc de un anticuerpo convencional, lo que le otorga mayor vida media de circulación y capacidad de interactuar con receptores Fc en células inmunitarias.

2.3.2. Modificación química

Los Nbs también pueden ser modificados químicamente para mejorar su funcionalidad para aplicaciones diagnósticas y terapéuticas. Un enfoque común es la funcionalización selectiva de lisinas, debido a la alta prevalencia de este residuo en casi todas las superficies proteicas. Esta modificación se realiza típicamente utilizando ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS), que reaccionan con el grupo ϵ -amino de los residuos de lisina del Nb para formar enlaces amida estables (**Figura 3A**) [57]. Este método se ha utilizado para conjugar ciertos Nbs a fluoróforos o inmovilizarlos en matrices para ser utilizados en microscopía de superresolución o en el desarrollo de biosensores [58], [59], [60], [61]. Sin embargo, algunas limitaciones de este método incluyen la posible pérdida de función

del Nb, especialmente si los residuos de lisina involucrados son críticos para la unión al antígeno o para la estabilidad estructural, y la obtención de mezclas heterogéneas de conjugados de Nbs [62].

Otro enfoque comúnmente utilizado es el etiquetado de residuos de cisteína no apareados. Los residuos de cisteína contienen un grupo tiol (-SH) que puede ser modificado selectivamente utilizando maleimidas, yodoacetamidas o reactivos de intercambio de disulfuro (**Figura 3B**) [63]. Este método permite la conjugación específica, sin afectar a otras partes del Nb, ya sea porque el Nb tiene una sola cisteína no apareada o porque se ha introducido en el extremo C-terminal mediante manipulación genética [57]. Algunos ejemplos incluyen la generación de biomarcadores, Nbs conjugados a sondas infrarrojas o radiomarcadores, para el diagnóstico *in vivo* de cáncer de mama y próstata, o la adición de polietilenglicol (PEG) a un Nb para prolongar su tiempo de circulación y protegerlo de la proteólisis o eliminación celular [64], [65], [66], [67]. Sin embargo, la introducción de cisteínas adicionales puede llevar a la dimerización de los Nbs y a una reducción en el rendimiento de su expresión [64], [68].

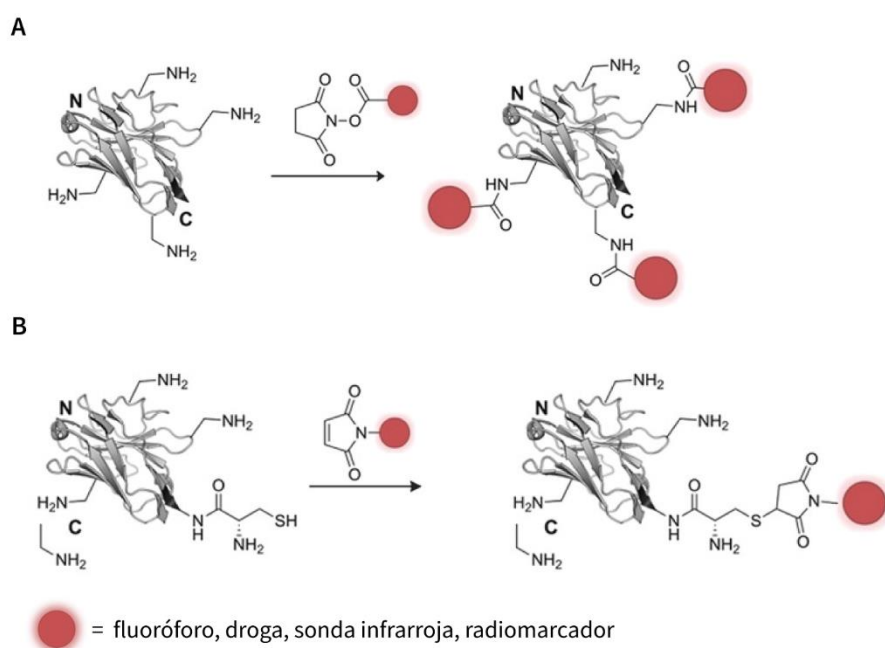


Figura 3. Modificaciones químicas de los Nbs. (A) Marcación al azar de los Nbs mediante la funcionalización de los residuos de lisina. Las sondas, fluoróforos o fármacos activados con NHS reaccionan con el grupo amina de un residuo de lisina expuesto al solvente. (B) Modificación de los Nbs mediante el etiquetado de residuos de cisteína no apareados. La incorporación de un solo residuo de cisteína en un Nb (principalmente en el extremo C-terminal) es una forma sencilla de marcar de manera específica estas moléculas. Imagen modificada de Schumacher *et al.* [57].

2.3.3. Modificación enzimática

La modificación enzimática implica el uso de enzimas específicas para agregar grupos funcionales a los Nbs sin alterar significativamente su estructura o afinidad. Por este motivo, este tipo de modificación es una estrategia más exitosa en comparación de la modificación química [69]. Este método se basa en el agregado de secuencias específicas en marco con las secuencias de los Nbs, que son reconocidas por una variedad de enzimas.

Por ejemplo, la sortasa A, una enzima transpeptidasa de *Staphylococcus aureus*, reconoce un motivo específico en el Nb (LPXTG), lo cliva y cataliza la unión de un nucleófilo (ver diagrama de la reacción en capítulo 3) [70]. Esta unión puede incluir diversos grupos funcionales como la biotina, péptidos específicos, oligonucleótidos, entre otros [71]. Esta estrategia se ha utilizado para generar dímeros o multímeros de Nbs altamente neutralizantes contra el SARS-CoV-2 o para la unión específica de fluoróforos o radiomarcadores para la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) y la tomografía por emisión de positrones (PET) [72], [73], [74], [75]. A su vez, se han funcionalizado Nbs dirigidos al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) con antígenos específicos con el fin de inducir y modular la respuesta inmune contra ciertos patógenos como SARS-CoV-2 o IAV [76], [77].

Además de la sortasa A, otras enzimas empleadas para la modificación de Nbs son las asparagil endopeptidasas, la biotín ligasa A (BirA), la enzima generadora de formilglicina (FGE), la butelasa 1 o la tubilina tirosina ligasa [71], [78].

2.4. Aplicaciones de los Nbs en virología

2.2.1. Herramientas moleculares

Numerosos Nbs han sido desarrollados para ser utilizados como herramientas que permitan reconocer, aislar o rastrear proteínas virales con el fin de dilucidar su función o contribución en el ciclo de replicación viral. Los Nbs conjugados a fluoróforos se han utilizado para detectar proteínas virales en células infectadas por SARS-CoV-2, el virus de Ébola o el virus de Marburgo [79], [80]. A su vez, la expresión intracelular de los Nbs, denominados *intrabodies*, permite estudiar la dinámica de las proteínas virales en tiempo real dentro de las células [81], [82], [83].

Además, los Nbs han demostrado ser de gran utilidad en la resolución de estructuras cristalográficas de ciertas proteínas virales, proporcionando una visión detallada de las interacciones a nivel molecular y facilitando el desarrollo de terapias antivirales más efectivas. Por ejemplo, el uso de Nbs contra poliovirus permitió estabilizar las estructuras de los viriones expandidos y proporcionar una visión más detallada de la conformación del virus, para entender con mejor precisión los cambios estructurales que ocurren durante la expansión del virión, un paso clave en la infección [84].

2.2.2. Aplicaciones diagnósticas

El diagnóstico de enfermedades infecciosas representa otra área en donde los Nbs son utilizados ampliamente. Propiedades intrínsecas de los Nbs como su alta especificidad y afinidad permiten el desarrollo de ensayos diagnósticos basados en Nbs con características comparables a aquellos ensayos que utilizan anticuerpos convencionales [85], [86], [87], [88], [89]. A su vez, la capacidad y facilidad en la modificación de estas moléculas los convierte en reactivos atractivos no solo para el desarrollo de ELISAs sino también para métodos más sensibles como detección electroquímica, biosensores, citometría de flujo o ensayos inmunocromatográficos de flujo lateral [85], [87], [90], [91], [92], [93], [94].

Los Nbs también pueden ser utilizados para monitorear la respuesta inmune durante o luego de las infecciones virales, proporcionando información crucial sobre el progreso de la enfermedad y la efectividad de respuestas inmunitarias o estrategias inmunológicas como las vacunas. Un ejemplo concreto para este fin es el trabajo en el que colaboré durante el desarrollo de esta tesis, que se centró en la generación de un ELISA competitivo para la detección de anticuerpos contra el virus de la hepatitis E [95]. Este ensayo demostró una alta sensibilidad y especificidad en la detección de anticuerpos en varias especies animales, como cerdos, jabalíes, ciervos y también en humanos, destacando su potencial para monitoreo de enfermedades zoonóticas.

Los desarrollos de ensayos diagnósticos en el contexto de la pandemia de COVID-19 han demostrado la relevancia de todos los puntos mencionados anteriormente. Un ejemplo notable es la generación de un Nb biparatópico, NM1267, que se utilizó para desarrollar el *NeutrobodyPlex*, un ensayo de unión multiplex competitivo que detecta anticuerpos neutralizantes y evalúa cualitativa y cuantitativamente la respuesta inmune en pacientes infectados y vacunados [96]. Otros investigadores han modificado Nbs dirigidos contra

SARS-CoV-2 con el fin de desarrollar un ELISA sándwich altamente sensible [97]. Adicionalmente, la versatilidad de los Nbs se refleja en la diversidad de formatos de ensayos diagnósticos que se han desarrollado (**Tabla 1**).

Tabla 1. Aplicaciones diagnósticas desarrolladas para la detección de SARS-CoV-2.

Transductor	Tipo de ensayo	Nb	Límite de detección	Refs.		
Óptico	Ensayo Molecular	ELISA basado en levaduras	Nb-33	0.037 µg/ml	[94], [98]	
		ELISA sándwich	C5, F2	16 TCID ₅₀ /ml	[97], [99]	
		ELISA sándwich	NTD E4-3, B6-1	4 ng/ml	[100]	
	Ensayo basado en nanopartículas	Nano2RED	RBD8, RBD10	1.3 pM (~40 pg/ml)	[101]	
		Ensayo de matriz fluida con partículas MagPlex	E2-C2, E2-E2	50 pg/ml (1.28 × 10 ³ PFU/ml)	[102]	
	Biosensor	LSPR	NB1D6, NB4E9	0.01 ng/ml	[103]	
		SPR	VHH 72	2.9 × 10 ⁴ partículas virales/ml	[104], [105]	
		BiMW	1.26	178 TCID ₅₀ /ml	[106], [107]	
	Electroquímico	Biosensor	PLA	Ty1	200 pM	[79], [108]
			Sensor de nanoporos	Ty1	115 pM	[79], [109]
Biosensor MIE			NIH-CoVnb-112	6–32 RNA copias/ml	[110], [111]	
OECT			VHH 72	48 fM	[104], [112]	
Inmunosensor PEC			Nb11-59	5 fg/ml	[113], [114]	

Fuente: Sung Park *et al.* [115].

2.2.3. Aplicaciones terapéuticas

Los Nbs también están emergiendo como candidatos prometedores para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Si bien el pequeño tamaño de estas moléculas representa una desventaja para aplicaciones terapéuticas debido a su rápida eliminación renal, la vida media de los Nbs puede aumentarse mediante diferentes modificaciones. Además, la multimerización de Nbs incrementa significativamente la potencia de neutralización y evita el escape viral, tal como se ha demostrado para SARS-CoV-2, el IAV, el virus

sincial respiratorio (RSV), el virus de la rabia, entre otros [52], [79], [116], [117], [118], [119], [120], [121].

La mayoría de los Nbs desarrollados en virología están dirigidos a proteínas estructurales de los virus, con el objetivo de interferir en su capacidad de unión a los receptores celulares o en la fusión de las membranas del virus y la célula hospedadora, impidiendo así la liberación del genoma viral. Esta tesis se presenta un ejemplo de dicha aplicación, con el desarrollo de Nbs específicos contra la proteína S de SARS-CoV-2, con el fin de bloquear su interacción con el receptor celular, contribuyendo así a inhibir la infección viral [98]. Otros ejemplos relevantes incluyen Nbs específicos para la proteína estructural VP6 de rotavirus, capaces de inhibir la unión del virus a la célula y proteger a ratones y cerdos neonatos de la infección; Nbs contra la proteína de envoltura del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), que impiden su unión al receptor CD4; y Nbs dirigidos a la proteína E1 de CHKV, que inhiben la infección al impedir la fusión de membranas del virus y la célula hospedadora [122], [123], [124], [125], [126]. Además, otros Nbs con actividad antiviral han sido desarrollados contra blancos virales intracelulares, como la nucleoproteína de IAV o del virus de la estomatitis vesicular [82], [127], [128], [129].

En ciertos casos, los Nbs no se han utilizado directamente como agentes antivirales, sino como vehículos para la entrega dirigida de moléculas terapéuticas, como ARN de interferencia o inmunotoxinas, que son las responsables de ejercer la actividad antiviral [130], [131].

La versatilidad de los Nbs se refleja no solo en el amplio rango de aplicaciones, sino también en las diversas rutas de administración posibles. Gracias a su alta estabilidad y solubilidad, los Nbs pueden administrarse mediante vías convencionales, como la intravenosa e intramuscular, como así también por inhalación o vía oral, rutas particularmente útiles en el tratamiento de infecciones respiratorias o gastrointestinales, respectivamente [132].

A pesar de que en la literatura existen numerosos reportes de Nbs con potencial terapéutico, sólo unos pocos han llegado a ensayos clínicos. Un ejemplo notable es ALX-0171, un Nb trivalente dirigido contra la proteína de fusión de RSV [133]. Este Nb demostró eficacia en estudios preclínicos y fases clínicas tempranas, especialmente por su capacidad para neutralizar el virus cuando se administra por inhalación [134]. Sin

embargo, estudios clínicos posteriores en infantes revelaron una disminución en títulos virales, pero sin una mejora significativa en el desenlace clínico, lo que limitó su éxito en los ensayos clínicos [135]. Otro Nb con actividad antiviral en llegar a ensayos clínicos fue XVR011, desarrollado contra el SARS-CoV-2. El tratamiento profiláctico y terapéutico de este Nb modificado, al cual se le agregó la región Fc de la inmunoglobulina tipo 1 humana (IgG1), protegió de manera exitosa a los ratones y hámsteres de la infección por SARS-CoV-2 [136]. El ensayo clínico de fase 1 evaluó su seguridad, tolerabilidad y farmacocinética mostrando un perfil de seguridad favorable. Sin embargo, durante la fase 2, el estudio fue retirado para rediseñar el ensayo clínico, principalmente porque la pandemia de COVID-19 dejó de ser considerada como tal.

A pesar de que aún no se han registrado casos de éxito en la autorización de Nbs terapéuticos para enfermedades virales, existen cuatro Nbs aprobados para su uso clínico en otras áreas [137]. Además, 15 Nbs se encuentran en diversas fases de ensayos clínicos para el tratamiento de enfermedades inmunológicas y oncológicas, lo que demuestra el potencial de estas moléculas como agentes terapéuticos efectivos [138].

3. Consideraciones finales y estructura de la tesis

Los últimos años han demostrado las graves consecuencias que pueden tener las infecciones virales estacionarias, emergentes y reemergentes, como queda demostrado en la circulación anual del virus de influenza, la pandemia de COVID-19 y los recurrentes brotes de dengue que afectan a varios países, especialmente en la región de las Américas. Estos eventos subrayan la necesidad crítica de contar con herramientas y estrategias innovadoras para la detección, control y tratamiento de amenazas virales. En este contexto, los Nbs han surgido como una plataforma robusta y versátil para el diagnóstico y tratamiento de infecciones virales debido a su alta afinidad, estabilidad estructural y capacidad para ser modificados con facilidad.

Esta tesis se centra en la generación, caracterización y modificación de Nbs dirigidos contra tres virus de particular relevancia: IAV, SARS-CoV-2 y DENV. A través de los resultados obtenidos, se demuestra como los Nbs pueden ser utilizados tanto en la detección temprana como en el tratamiento de infecciones virales, destacando su potencial como plataforma sólida en la preparación y respuesta a futuros brotes.

El capítulo 1 retoma un tema iniciado durante mi tesis de licenciatura, con el fin de estudiar si los Nbs dirigidos contra una de las proteínas de estructura del IAV tenían

capacidad de neutralizar diferentes subtipos del virus. Durante el desarrollo de estos ensayos, emergió el SARS-CoV-2, provocando la mayor pandemia del último siglo. Ante esta emergencia, científicos de todo el mundo redirigieron sus temas de investigación para comprender rápidamente la biología del SARS-CoV-2 y desarrollar herramientas para detectar, prevenir o tratar la infección. El capítulo 2 de esta tesis detalla como nuestro grupo de investigación utilizó el conocimiento y experiencia en virus respiratorios y Nbs para desarrollar una molécula con actividad antiviral contra SARS-CoV-2.

En 2023, cuando finalmente la pandemia de COVID-19 dejó de ser considerada como tal, se registró un brote de dengue sin precedentes en toda la región de las Américas. En Argentina, se reportaron 133.344 casos de dengue, y la cifra en lo que va del 2024 es aún más alarmante, con más de 760.116 casos totales. Sin embargo, sólo el 25% de estos ha sido confirmado por laboratorio debido a la falta de insumos para la correcta detección de la infección. El capítulo 3 describe la modificación de Nbs contra la proteína no estructural 1 (NS1) de DENV, utilizada como marcador temprano de la infección, y su aplicación en el desarrollo de un ensayo diagnóstico para esta enfermedad.

En conclusión, esta tesis no solo contribuye al avance en el uso de Nbs en virología, sino que también demuestra que nuestro grupo de investigación cuenta con una base sólida para futuras investigaciones y desarrollos que puedan responder de manera eficiente a las amenazas virales emergentes y reemergentes.

Capítulo 2: Caracterización de Nbs anti-HA para el tratamiento o diagnóstico de la infección por IAV.

1. Introducción

1.1. Estructura del virus de influenza A

El virus de influenza pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* y se clasifica en cuatro tipos (A, B, C y D) según la identidad de dos proteínas del virus, la nucleoproteína (NP) y la proteína de matriz (M1).

El virus de influenza A es un virus envuelto, esférico o filamentoso, cuyo diámetro varía entre 100 y 200 nm (**Figura 4A**) [139]. Su genoma consta de ocho segmentos de ARN monocatenario de polaridad negativa que codifican para al menos 17 proteínas (**Figura 4B**) [140], [141]. La membrana externa del virus deriva de la membrana lipídica de la célula hospedadora y contiene espigas de las glicoproteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) en una relación 4:1 [142]. Una tercera proteína, M2, atraviesa la membrana viral y forma un canal iónico que juega un papel importante en la liberación del genoma viral durante la entrada del virus a la célula [139]. Por debajo de esta envoltura se encuentra la proteína M1, que proporciona estabilidad estructural y participa en el ensamblaje y brotación de nuevas partículas virales [143]. Dentro de la matriz M1 se encuentran el complejo de ribonucleoproteínas (RNP), conformado por el ARN genómico asociado a tres polimerasas (PA, PB1 y PB2) y la NP, componentes esenciales para la replicación viral [142], [144].

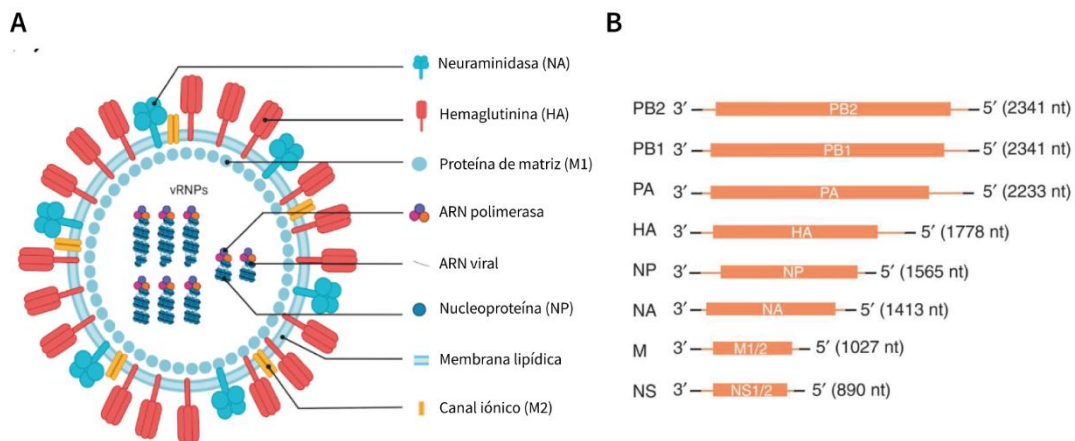


Figura 4. (A) Estructura del virión del IAV. (B) Organización genómica: los ocho segmentos de ARN monocatenario codifican para PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M y NS, respectivamente (indicado en recuadro naranja). Las líneas negras al final de cada segmento de ARN indican las regiones no traducidas 5' y 3', mientras que las líneas naranjas indican las señales de empaquetamiento. Adaptado de Abubakar *et al.* y Fodor *et al.* [145], [146].

El genoma del IAV también codifica para algunas proteínas no estructurales que están implicadas en la regulación celular (**Figura 4B**). El segmento de ARN que codifica para PB1 posee un marco abierto de lectura solapado, que da lugar a una proteína no estructural con función pro-apoptótica denominada PB1-F2, y para N40 que juega un papel importante en la replicación viral [147]. Una tercera proteína no estructural (NS1) está implicada en numerosas interacciones en la célula hospedadora, incluyendo los mecanismos antivirales de escape [140].

Dentro de las proteínas de membrana del virus, la HA es el principal antígeno viral que induce la producción de anticuerpos neutralizantes. Esta proteína no solo permite el reconocimiento y unión del virus a la célula hospedadora, sino que también media la fusión entre la partícula viral y la membrana celular durante la entrada del virus a la célula [148]. La HA se sintetiza en el retículo endoplásmico (RE) rugoso como un único polipéptido (HA0, ~61 kDa) que luego es procesado por proteasas celulares en dos cadenas polipeptídicas (HA1 y HA2) unidas por un puente disulfuro [144], [149]. Estructuralmente, la HA es una proteína integral de membrana compuesta por tres monómeros (**Figura 5**). Cada monómero comprende dos dominios: un dominio globular ubicado sobre un dominio de tallo [150]. El dominio globular, compuesto mayormente por la cadena HA1, contiene el sitio de unión al receptor, mientras que la región del tallo, formado por una parte de HA1 y HA2, ancla la proteína a la membrana y contiene el péptido hidrofóbico necesario para la fusión de las membranas viral y de la célula hospedadora [150], [151], [152], [153]. La mayoría de los anticuerpos generados durante la infección se dirigen contra sitios antigénicos situados en el dominio globular, el cual es altamente variable entre diferentes subtipos. Por oposición, la región del tallo está relativamente conservada y los anticuerpos producidos contra esta región son capaces de brindar protección cruzada contra diferentes subtipos [154], [155].

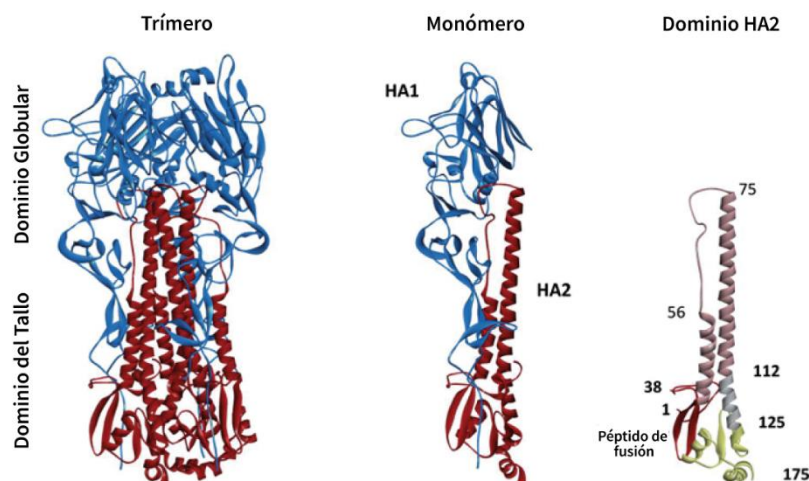


Figura 5. Estructura del trímero, monómero y dominio HA2 de la HA. En las estructuras del trímero y monómero de HA, el dominio globular inmunodominante y el dominio del tallo están coloreados en azul y rojo, respectivamente. A pesar de la posición menos accesible del HA2 dentro de la molécula, se han determinado cuatro regiones antigénicas en esta región. Sitio antigénico I: rojo (AA 1–38) que contiene el péptido de fusión; dos sitios antigénicos diferentes II y IV en la misma región: amarillo (AA 125–175); y sitio III: rosa (AA 38–112). Fuente: Kostolansky *et al.* [156].

Los IAV se dividen en distintos subtipos según las variaciones antigénicas en sus proteínas de superficie, HA y NA [142]. Actualmente se han descrito 18 subtipos de HA y 11 subtipos de NA del virus de influenza A, todos los cuales infectan aves, excepto H17N10 y H18N9, que se encuentran en murciélagos [157], [158]. En humanos, los subtipos H1, H2 y H3 de HA y N1 y N2 de NA son responsables de pandemias y epidemias anuales [159]. Sin embargo, se han reportado infecciones esporádicas con los virus con potencial pandémico, como H5 y H7. Estos subtipos, típicamente aviares, han demostrado capacidad para infectar a humanos con alta letalidad pero sin transmisión sostenida, como en los casos de H5N1 y H7N9 [7], [160], [161].

1.2. Ciclo de replicación del virus de influenza A

El ciclo de replicación del IAV ocurre principalmente en las células epiteliales del tracto respiratorio de humanos y otros mamíferos, y en las células epiteliales del intestino de las aves [162]. Este ciclo inicia cuando el virus se une a los receptores de la membrana de la célula hospedadora, específicamente glicoproteínas y glicolípidos que contienen ácido siálico, a través de la HA (**Figura 6**). La HA reconoce preferentemente uno de los dos tipos de unión ácido siálico-galactosa, dependiendo de la especie del hospedador [139]. Los virus aviares y equinos se unen a los receptores de ácido siálico unidos a galactosa

mediante uniones $\alpha(2,3)$; mientras que los virus que infectan humanos reconocen preferentemente moléculas de ácido siálico con uniones $\alpha(2,6)$ [163]. Por otro lado, los cerdos poseen receptores con ambos tipos de uniones, lo que facilita su susceptibilidad a infecciones tanto de cepas aviares como humanas [164].

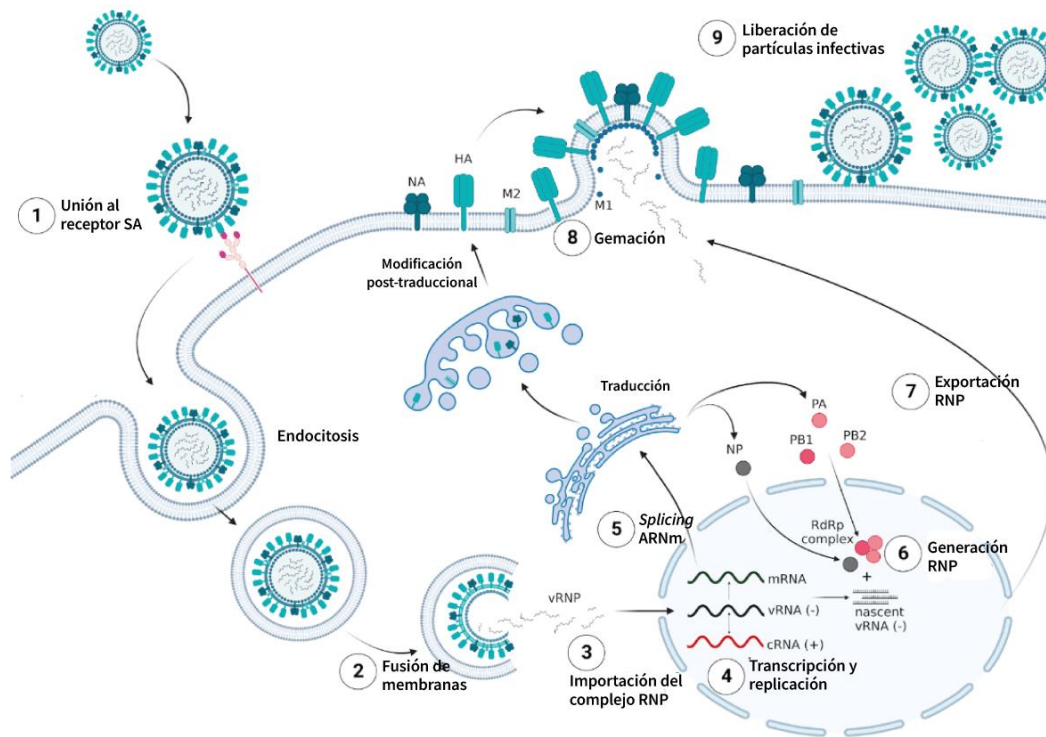


Figura 6. Ciclo de replicación viral del IAV.

Luego de la unión al receptor, el virus ingresa a la célula mediante endocitosis mediada principalmente por vesículas revestidas de clatrina [139]. Dentro del endosoma, el ambiente ácido induce un cambio conformacional en la HA, en donde se expone el péptido de fusión de la subunidad HA2 y facilita la fusión de las membranas viral y endosomal [142]. El pH bajo del endosoma también activa al canal iónico M2, el cual acidifica el interior del virus, liberando el complejo de RNP al citoplasma de la célula hospedadora [163], [165]. Así, el ARN viral (ARNv) y sus proteínas se transportan al núcleo de la célula hospedadora gracias a las señales de localización nuclear presentes en el complejo de RNP.

Una vez translocados al núcleo, la ARN polimerasa transcribe y replica el ARNv en tres tipos de moléculas de ARN: el ARN complementario de polaridad positiva, que se utiliza como templatado para generar más moléculas de ARNv; ARNs pequeños de polaridad negativa, los cuales se creen que regulan el cambio de la transcripción al proceso de

replicación [166]; y ARNs mensajeros virales, que se exportan del núcleo al citoplasma para la traducción de proteínas [158]. Las ARN polimerasas virales y la NP, producidas en el citoplasma son importadas al núcleo para aumentar la tasa de síntesis del ARNv [143]. Por otro lado, las proteínas de superficie HA, NA y M2 son sintetizadas en los ribosomas presentes en las membranas del retículo plasmático. Allí se pliegan y son glicosiladas para luego ser transportadas al aparato de Golgi, donde sufren modificaciones postraduccionales, y finalmente a la superficie celular, donde se integran a la membrana.

En las etapas finales de la infección, la proteína M1 y NEP permanecen en el núcleo y se asocian al complejo RNP viral para mediar su transporte al citoplasma y posteriormente a la membrana plasmática [162]. Las partículas virales se ensamblan en la superficie celular a través del proceso de brotación, que ocurre principalmente en los dominios de balsas lipídicas de la membrana [167]. Para que dichas partículas sean liberadas, la NA debe romper las uniones presentes entre el ácido siálico y la hemaglutinina, permitiendo la diseminación del virus e infección de nuevas células [142].

1.3. Prevención y tratamiento de la infección

La influenza estacionaria constituye una gran amenaza para la salud pública a nivel mundial, causando aproximadamente 1.000 millones de casos anuales y entre 290.000 y 650.000 muertes relacionadas con complicaciones respiratorias [168], [169]. Por este motivo, la prevención y el tratamiento de la infección constituyen pilares fundamentales para mitigar su impacto y mejorar la respuesta ante los brotes epidémicos y pandémicos.

Hoy en día, las vacunas representan la herramienta más efectiva para reducir la incidencia de la enfermedad y la severidad de sus síntomas. La composición de las mismas se revisa anualmente por el “Sistema de Respuesta y Vigilancia de Influenza a Nivel Mundial” (GISRS) debido a la alta capacidad de mutación y deriva antigénica del virus, que conlleva la aparición de nuevas cepas circulantes [170]. Estas vacunas suelen basarse en virus inactivados o atenuados que inducen la producción de anticuerpos neutralizantes contra HA y NA [171]. Sin embargo, la efectividad de las vacunas puede variar de año en año y depende de la correspondencia entre las cepas vacunales y los virus circulantes en la población [172].

Por otra parte, el tratamiento de la infección por el IAV se basa en el uso de agentes antivirales, como los inhibidores de la neuraminidasa (oseltamivir, zanamivir y peramivir) y los inhibidores de la polimerasa (baloxavir marboxil), que actúan impidiendo la liberación de nuevas partículas virales o interfiriendo en la replicación del ARNv, respectivamente [173], [174], [175]. Estos tratamientos son más efectivos cuando se administran en las primeras 48 horas tras el inicio de los síntomas, ya que reducen la duración de la enfermedad y la severidad de las complicaciones. Sin embargo, su uso no es 100% efectivo, ya que pueden surgir algunas mutaciones que vuelven al virus resistente debido a la presión selectiva inducida por dichos antivirales, como la sustitución H274Y en el gen de la NA que confiere resistencia a oseltamivir y peramivir [176]. De esta manera, la emergencia de múltiples cepas resistentes a estos fármacos representa un desafío para el manejo clínico de la enfermedad, subrayando la necesidad de una mejora en el desarrollo de fármacos y de nuevas estrategias antivirales, como la generación de agentes terapéuticos de amplio espectro.

1.4. Influenza y zoonosis

La influenza aviar y porcina representan amenazas significativas tanto para la salud animal como para la salud humana, debido a su potencial transmisión entre especies y a sus graves consecuencias económicas y sanitarias. Las aves silvestres actúan como el principal reservorio natural para la mayoría de los IAV, portándolos frecuentemente de manera asintomática [177]. Sin embargo, algunos subtipos del virus, como H5 y H7, pueden evolucionar hacia formas altamente patogénicas (HPAIV), causando brotes devastadores de influenza aviar, en particular en poblaciones de aves de corral [178]. Estos brotes pueden alcanzar tasas de mortalidad de hasta el 100% en aves infectadas, lo cual tiene consecuencias catastróficas no solo para la economía avícola, sino también para la seguridad alimentaria en las regiones afectadas [177], [179].

Recientemente, se ha reportado un brote de HPAIV H5N1 en ganado vacuno, indicando la capacidad de este virus de adaptarse a nuevos hospedadores y despertando preocupaciones tanto en el ámbito de la salud animal como humana [8], [180]. La infección en bovinos se ha asociado con síntomas respiratorios leves a moderados, pero

su verdadera implicancia en la dinámica de transmisión viral y su potencial zoonótico aún son inciertos.

A su vez, algunos subtipos de HPAIV, como el H5N1 y el H7N9, han demostrado capacidad zoonótica al cruzar la barrera de especie e infectar seres humanos y otros mamíferos [160], [161]. Estos virus son altamente mortales para humanos; hasta febrero de 2024, se han reportado 887 casos confirmados de infecciones humanas con H5N1, con una mortalidad del 52.08%, una tasa considerablemente más alta que el 0.1% característico de la gripe estacional, para la cual se cuenta con vacunas [181]. Aunque la transmisión sostenida entre humanos de estos subtipos es limitada, la posibilidad de que ocurra una recombinación genética que facilite esta propagación es una amenaza latente, lo que subraya la importancia de la vigilancia de estas cepas en los programas de salud pública a nivel mundial.

La influenza porcina también plantea riesgos considerables para la salud pública y la industria. Los subtipos H1N1, H1N2 y H3N2 del IAV son endémicos en poblaciones de cerdo a nivel global, ocasionando brotes con altas tasas de morbilidad, pero con una mortalidad relativamente baja [182]. Sin embargo, el impacto en la mortalidad y en las pérdidas económicas dentro de la industria porcina aumenta notablemente en casos de co-infección con otros patógenos respiratorios [183], [184].

En su tracto respiratorio, los cerdos poseen receptores de ácido siálico tanto de tipo α -2,3, característicos de las aves, como de tipo α -2,6, propios de los humanos [164]. Esta característica les permite ser infectados simultáneamente por virus de influenza de origen aviar y humano, facilitando la recombinación genética entre diferentes subtipos [185]. Esta mezcla genética puede generar nuevas variantes virales con potencial de transmisión zoonótica, adaptadas para infectar a los humanos. Un ejemplo claro de este fenómeno fue la pandemia de H1N1 en 2009, donde surgió una cepa resultante de la combinación de genes de influenza de origen humano, aviar y porcino [186].

2. Objetivos

Teniendo en cuenta el creciente desafío que representan las cepas de influenza resistentes a los fármacos actuales y la necesidad urgente de desarrollar nuevas estrategias

antivirales, en esta parte de la tesis propusimos una solución innovadora a través de la producción de Nbs dirigidos contra la proteína HA de diversas cepas de influenza. Este enfoque no solo buscó ofrecer una alternativa terapéutica efectiva y adaptada a la constante evolución del virus y su capacidad de mutación y deriva antigénica, sino también responder a la amenaza de zoonosis y el potencial pandémico que representan la influenza aviar y porcina. Es por eso que el objetivo general de este trabajo consistió en **desarrollar y caracterizar Nbs que reconozcan a la proteína HA de diferentes cepas de influenza para ser utilizados como moléculas antivirales de amplio espectro.**

Los objetivos específicos de este trabajo fueron:

- 1) Expresar y purificar Nbs bivalentes y fusionados al dominio Fc de las inmunoglobulinas de ratón.
- 2) Estudiar la capacidad inhibitoria *in vitro* de los Nbs monovalente, bivalentes y fusionados al dominio Fc frente a la infección viral causada por diferentes subtipos del IAV.

3. Antecedentes

Con el objetivo de obtener Nbs capaces de reconocer varias cepas del IAV, se inmunizaron dos llamas (*Lama glama*) con proteínas recombinantes de la región del tallo de la HA de las cepas H3 equina y H5 humana. Esta estrategia fue utilizada para dirigir la respuesta inmune de la llama al dominio del tallo que se encuentra altamente conservado entre los diferentes subtipos de IAV, dado que el dominio globular suele enmascarar esta región. A su vez, se realizaron refuerzos con virus H1N1 y H3N2 humanos provenientes de vacunas comerciales.

Luego de la inmunización de la llama y la construcción de la biblioteca de Nbs, se seleccionaron 6 Nbs específicos dirigidos contra la HA de las cepas H3 equina y H5 humana. Durante mi trabajo de tesis de licenciatura, se expresaron y purificaron 2 de estos 6 Nbs que poseían mayor variabilidad en la secuencia (Nb-2 y Nb-4) y se caracterizaron mediante ELISA. Se observó así que cuando la HA del virus está completa, los 2 Nbs en estudio únicamente reconocen al virus pandémico H1N1. Sin embargo, al aplicar un tratamiento de manera de simular las condiciones necesarias para

la entrada del virus a la célula y eliminar la región globular de la HA, se observó que los Nbs tenían reactividad cruzada, al ser capaces de reconocer distintos subtipos del IAV (H1N1, H3N2, H3N8, H5N1, H7N9 y H9N2) (**Anexo 1**).

A su vez, se generaron diversas construcciones que permitieron la modificación de los Nbs: Nbs bivalentes (dos Nbs unidos a través de un *linker* de 20 AA compuesto por glicinas y serinas) y Nbs fusionados al dominio Fc de las inmunoglobulinas de ratón (Nbs Fc). Estas modificaciones tenían como objetivo aumentar la valencia de los Nbs y, en consecuencia, mejorar la afinidad y su capacidad inhibitoria. La región Fc también prolonga el tiempo de vida media en sangre debido al aumento en tamaño de la molécula y le confiere funciones efectoras dependiente de anticuerpos, dos características clave para el desarrollo de moléculas antivirales.

4. Resultados

Todos los resultados informados en este capítulo se realizaron en el laboratorio del Dr. Xavier Saelens en el Instituto de Flandes de Biotecnología (Gante, Bélgica), bajo el marco de una estancia de investigación de 3 meses.

4.1. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

4.1.1. Expresión y purificación de Nbs bivalentes

Durante el desarrollo de mi tesis de licenciatura, se intentó expresar a mediana escala los Nbs bivalentes generados. Sin embargo, los rendimientos obtenidos luego de la purificación eran considerablemente bajos (0,15 mg/l a 1 mg/l). Luego de un análisis de secuencia del vector utilizado para la expresión de estas moléculas, se observó que el bajo rendimiento de producción se debía a una mutación puntual en la secuencia líder N-terminal de la peptidasa B de *Erwinia carotovora* (*pelB*, secuencia de secreción a periplasma). Para resolver este problema, se subclonó la secuencia de ADN correspondiente a los Nbs bivalentes en un vector de expresión que contenía la secuencia de secreción periplásmica correcta.

Los Nbs fueron expresados en células *E. coli* WK6 y purificados desde el periplasma bacteriano mediante cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC). La modificación realizada permitió una mejora significativa en la expresión y purificación

de los Nbs bivalentes, lo cual se refleja en un incremento en la intensidad de bandas observadas en las fracciones de elución del Nb bivalente con la mutación corregida (**Figura 7**). Esta modificación permitió alcanzar rendimientos en el rango de 5 a 10 mg/l.

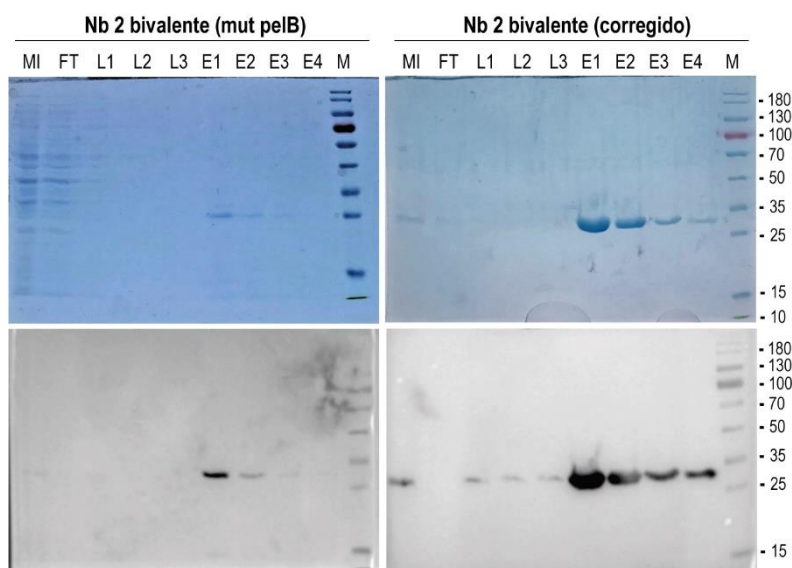


Figura 7. Expresión y purificación del Nb-2 bivalente con la mutación puntual en la secuencia pelB y del Nb-2 bivalente corregido. Perfiles proteicos en diferentes etapas de la purificación en membranas de nitrocelulosa reveladas mediante *Western blot* (panel inferior) y geles SDS-PAGE teñido con azul de *Coomassie* (panel superior). MI: muestra inicial antes de pasar por la resina. FT: fracción no unida a la resina. L1, L2 y L3: lavados. E1, E2, E3 y E4: eluciones. M: marcador de PM en kDa.

4.1.2. Expresión y purificación de Nbs Fc

Los plásmidos que contenían las secuencias de los Nbs fusionados al dominio Fc se transfectaron en células HEK-293 en suspensión utilizando polietilenimina (PEI) como agente de transfección. Seis días posteriores a la transfección, se recolectaron los sobrenadantes de cultivo para proceder a la purificación de los Nbs Fc.

La purificación se llevó a cabo en un sistema AKTA empleando columnas de níquel HisTrap™ HP (**Figura 8A**). Todas las fracciones correspondientes a los dos picos obtenidos en el cromatograma de la purificación se analizaron por SDS-PAGE (**Figura 8A y B**). En las calles 3 a 10 del pico 2, se observó una banda predominante de 45 kDa, correspondiente al PM esperado de una cadena de los Nbs Fc. Los rendimientos obtenidos fueron altos, alcanzando aproximadamente 25 mg/l para el Nb-2 Fc y 18 mg/l para el Nb-4 Fc, lo que demuestra la eficiencia de este sistema para la producción a mediana escala de estas moléculas.

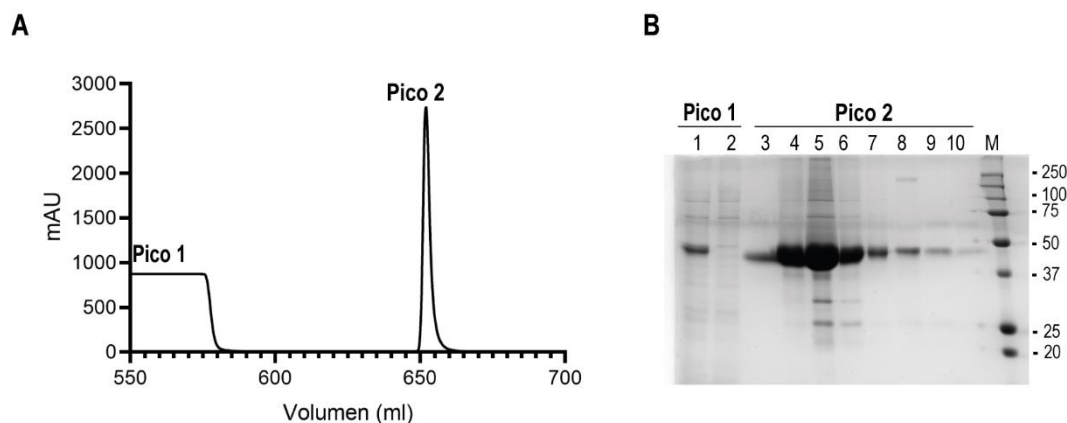


Figura 8. Figuras representativas de la purificación de los Nbs Fc. (A) Perfil de la IMAC de la purificación del Nb-2 Fc. (B) Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de *Coomassie* de las fracciones del pico 1 (calles 1 y 2) y del pico 2 (calles 3 a 10) de la purificación del Nb 2 Fc. M: marcador de PM en kDa.

4.2. Estudio de la capacidad neutralizante e inhibitoria de las moléculas generadas

4.2.1. Ensayo acelerado de inhibición viral con lectura de NA (AVINA)

Para evaluar la capacidad inhibitoria de los diferentes formatos de Nbs obtenidos, se utilizó el ensayo AVINA, previamente optimizado en el laboratorio del Dr. Saelens. Este ensayo se basa en la medición de la actividad de la NA del virus de influenza, lo que permite cuantificar indirectamente la replicación viral. En el caso de inhibición exitosa, la disminución de la actividad de NA indicaría una reducción en la replicación del virus, sugiriendo la efectividad de la molécula evaluada.

Inicialmente, se evaluó si los diferentes anticuerpos desarrollados contra el tallo de HA eran capaces de inhibir la actividad viral de los subtipos H1N1 y H3N8. Los resultados del ensayo demostraron que ninguna de las moléculas desarrolladas logró inhibir la replicación viral en ambos subtipos, ya que no se observó una reducción en la actividad de NA (**Figura 9**). En consecuencia, debido a la falta de eficacia de los anticuerpos en estudio contra estos subtipos, no se continuó con este ensayo con otros subtipos del virus.

Por otro lado, no se pudo determinar la capacidad neutralizante de las construcciones generadas para el Nb-4, ya que el mismo perdió completamente su capacidad de reconocimiento a los diferentes subtipos de IAV cuando se multimerizó.

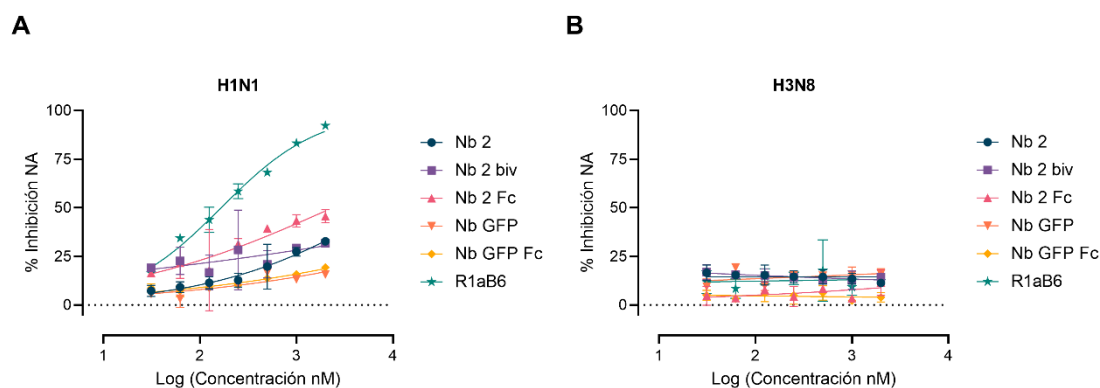


Figura 9. Determinación de la actividad de la NA de los subtipos (A) H1N1 y (B) H3N8 frente a los anticuerpos desarrollados. El Nb R1aB6 fusionado al dominio Fc fue utilizado como control positivo ya que posee reactividad cruzada y es capaz de neutralizar algunos subtipos de IAV [187]. Dos anticuerpos irrelevantes, en su formato monomérico o fusionado al dominio Fc, dirigidos contra GFP se utilizaron como controles negativos del ensayo.

4.2.2. Ensayo de microneutralización

El ensayo de microneutralización (MN) representa otro método para evaluar la capacidad inhibitoria de los anticuerpos generados, proporcionando una medida directa de su eficacia en la neutralización de la infección viral. Para este estudio, se puso a punto el ensayo siguiendo el protocolo descrito por Hufton *et al.* [187].

Los resultados obtenidos indicaron que sólo el Nb-2 Fc posee actividad neutralizante frente al subtipo H1N1 (IC_{50} 473.4 nM), pero únicamente al ser utilizado en altas concentraciones (**Figura 10A**). Para el caso del subtipo H3N8, ninguno de los anticuerpos presentó actividad neutralizante (**Figura 10B**).

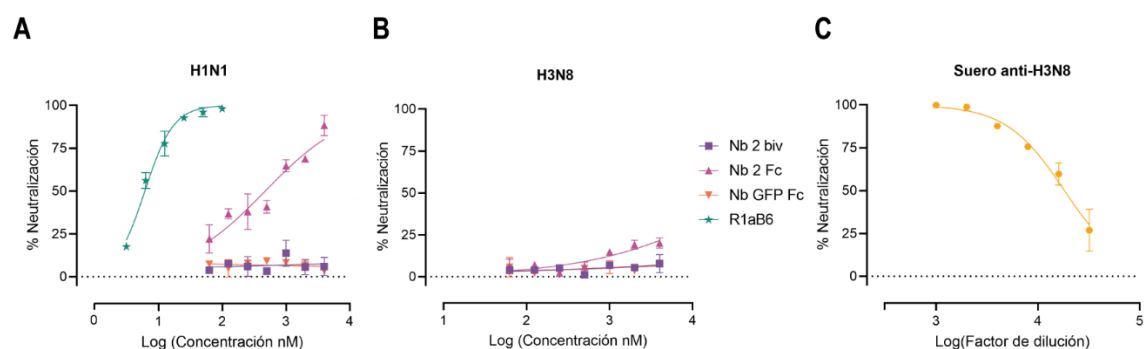


Figura 10. Determinación de la actividad neutralizante de los anticuerpos desarrollados contra el subtipo H1N1 (A) y H3N8 (B) del virus de influenza. El Nb R1aB6 fusionado al dominio Fc fue utilizado como control positivo para el subtipo H1N1 y el Nb GFP Fc como control negativo del ensayo. (C) Dado que el Nb R1aB6 no es capaz de neutralizar el subtipo H3N8 se utilizó un suero

proveniente de un ratón inmunizado con virus inactivado de H3N8 como control positivo de dicho ensayo.

4.2.3. Estudio de la inhibición de la hemólisis de glóbulos rojos

Teniendo en cuenta que los Nbs seleccionados están dirigidos contra la región conservada del tallo de la HA, es posible que su mecanismo de acción no implique directamente la neutralización de la infección, sino la inhibición de etapas posteriores en el ciclo de replicación viral, como la fusión de las membranas del virus y del endosoma. Esto explicaría la razón por la cual los otros dos ensayos, en los cuales se evaluó la capacidad neutralizante, indican que estas moléculas no son efectivas para bloquear de la entrada del virus a la célula. Algunos estudios han demostrado que anticuerpos dirigidos contra esta región de la HA puede ser más efectivos en ensayos funcionales que evalúan la capacidad de inhibir la fusión de membranas [188], [189].

El ensayo de inhibición de la hemólisis de glóbulos rojos permite estudiar la capacidad de los anticuerpos de interferir con este proceso. Este ensayo se basa en la capacidad de la HA de inducir la fusión de membranas bajo condiciones ácidas, como las que se encuentran en los endosomas, lo que resulta en la lisis de glóbulos rojos expuestos al virus. Así, inhibidores efectivos de la fusión deberían disminuir o eliminar la hemólisis inducida por el IAV.

Para este trabajo, se intentó establecer las condiciones óptimas del ensayo utilizando diferentes concentraciones de virus y ajustando parámetros experimentales basados en protocolos publicados [190], [191]. Sin embargo, a pesar de múltiples intentos, no se logró reproducir consistentemente los parámetros para obtener resultados concluyentes. En particular, se observó que la hemólisis de los glóbulos rojos al incubarse únicamente con el virus era inconsistente; mientras que en algunos experimentos se presentaba claramente, en otros no se logró reproducir el mismo resultado.

5. Discusión

La influenza A representa un desafío persistente para la salud pública y animal debido a su capacidad de mutación y recombinación genética, procesos que facilitan la aparición de nuevas cepas con potencial pandémico, como quedó demostrado con la pandemia de H1N1 en 2009. La búsqueda de herramientas eficaces para combatir y monitorear esta

enfermedad es una prioridad a nivel global, especialmente en un contexto donde la detección temprana y la respuesta rápida son cruciales para mitigar los impactos sanitarios y económicos. La identificación de anticuerpos monoclonales ampliamente neutralizantes, aislados de humanos y dirigidos a la región conservada del tallo de la HA, ha proporcionado información valiosa para el desarrollo de terapias efectivas [192]. En este contexto, el presente estudio se enfocó en el desarrollo de Nbs dirigidos al tallo de la HA con el objetivo de generar moléculas antivirales de amplio espectro. Estas moléculas tienen un potencial significativo no solo en estrategias terapéuticas, sino también en el desarrollo de sistemas de diagnóstico que contribuyan a la vigilancia epidemiológica.

Durante el desarrollo del proyecto, los ensayos de AVINA y MN, utilizados para evaluar la capacidad neutralizante de los Nbs, no mostraron los resultados esperados. La ausencia de actividad neutralizante sugiere que estos Nbs no actúan bloqueando la entrada viral, sino que podrían interferir en etapas posteriores del ciclo de replicación viral. Esta hipótesis es consistente con estudios previos que han demostrado que el mecanismo de acción de los anticuerpos dirigidos al tallo de HA, capaces de neutralizar múltiples subtipos de IAV, ocurre principalmente inhibiendo la actividad de la fusión de las membranas [188], [189], [193], [194], [195], [196]. Este mecanismo resalta la importancia de explorar métodos alternativos para evaluar la eficacia antiviral en etapas posteriores a la entrada del virus a la célula.

El ensayo de inhibición de hemólisis, planteado como una alternativa para evaluar la capacidad de los Nbs de inhibir la fusión de membranas, presentó múltiples desafíos técnicos. Las dificultades en la estandarización del ensayo podrían atribuirse a la sensibilidad de las condiciones experimentales, incluyendo el pH del *buffer* y la calidad de los glóbulos rojos utilizados. Como alternativas, se consideraron ensayos más robustos, como aquellos basados en liposomas marcados con fluoróforos o ensayos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), que permiten monitorear la fusión de membranas de manera más precisa [197], [198]. Sin embargo, la falta de equipamiento adecuado limitó la implementación de estas técnicas en este estudio.

A pesar de que los Nbs desarrollados no mostraron eficacia como agentes antivirales neutralizantes, su capacidad para reconocer múltiples subtipos de influenza A destaca su valor para aplicaciones diagnósticas. Esto es especialmente relevante dentro del enfoque *One Health*, que tiene como objetivo integrar y optimizar la salud de las personas, los animales y los ecosistemas [199]. Estos Nbs podrían ser herramientas clave para la vigilancia epidemiológica, facilitando la detección temprana de cepas de influenza con potencial pandémico en criaderos de aves, porcinos y ganado vacuno, y eventualmente en poblaciones de aves silvestres. La detección temprana es esencial para prevenir la transmisión a humanos y contener los brotes. Además, estos Nbs y sus variantes modificadas pueden ser utilizados para el desarrollo de *kits* diagnósticos portátiles, accesibles y de bajo costo, contribuyendo significativamente a la capacidad global de respuesta ante emergencias sanitarias.

Capítulo 3: Desarrollo de Nbs capaces de neutralizar la infección causada por el SARS-CoV-2

1. Introducción

1.1. Estructura del SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 es un virus envuelto, de ARN simple cadena y polaridad positiva que pertenece al género Beta coronavirus [200]. El genoma de SARS-CoV-2 posee un tamaño de aproximadamente 30 kb y contiene 14 marcos de lectura abiertos (ORFs) que codifican un total de 31 proteínas (**Figura 11A**) [200].

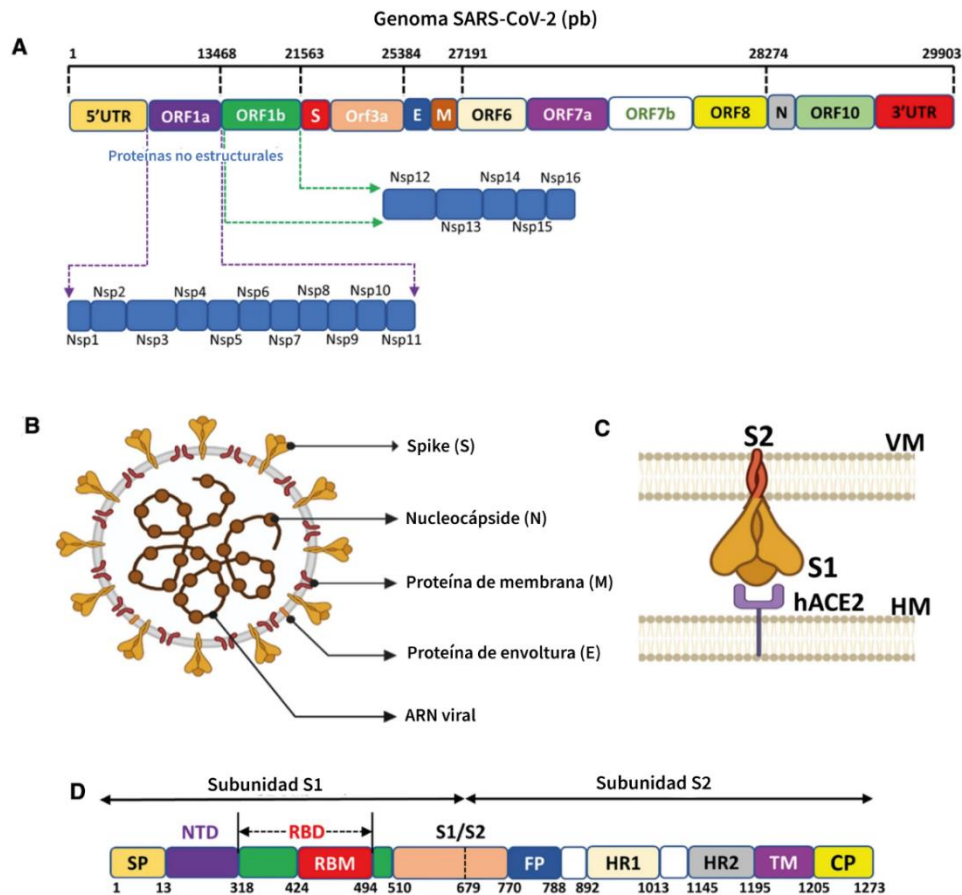


Figura 11. Estructura y organización genómica de SARS-CoV-2. (A) Representación esquemática de la organización del genoma de SARS-CoV-2. (B) Esquema de la estructura del virus SARS-CoV-2. (C) Interacción entre la proteína S y el receptor ACE2. (D) Organización del gen que codifica para la proteína S, indicando las subunidades S1 y S2. Fuente: Gupta *et al.* [201].

La traducción de ORF1a y ORF1ab da origen a dos grandes poliproteínas, pp1a y pp1ab, que son procesadas por una proteasa viral en 16 proteínas no estructurales (nsp) esenciales para la replicación del genoma y regulación temprana de la transcripción [202]. Las proteínas estructurales del virus, *Spike* (S), la proteína de envoltura (E), la proteína de membrana (M) y la nucleoproteína (N) están codificadas por 4 ORFs diferentes (**Figura 11A y B**). Estas proteínas son comunes a todos los coronavirus y están involucradas en la formación del virión y en la supresión de la respuesta inmune [203].

Además, un grupo de genes codifican para 7 proteínas accesorias (ORF3a, ORF3b, ORF3c, ORF3d, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b, ORF9c y ORF10) que están involucradas en la regulación de la infección viral y son determinantes de la patogenicidad del virus [204].

Entre las proteínas estructurales del virus, la proteína S es el principal determinante de la respuesta inmune antiviral y un blanco crítico en la generación de anticuerpos neutralizantes [205]. La proteína S es un homotrímero que se encarga de unir e internalizar el virus en las células hospedadoras a través de su interacción con los receptores de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) presentes en la superficie celular (**Figura 11C**) [206], [207]. Esta glicoproteína de membrana le da forma a la superficie viral similar a una corona solar, que le confiere a los coronavirus su característica morfológica distintiva [208].

La proteína S de SARS-CoV-2 posee un tamaño molecular de aproximadamente 150 kDa y está compuesta por dos subunidades, S1 y S2 (**Figura 11D**). La subunidad S1 posee cuatro dominios definidos: el dominio amino-terminal (NTD), el dominio de unión al receptor (RBD) y dos dominios carboxi-terminales (S1 y S2) [208]. Esta subunidad, en particular RBD, es la responsable de la unión al receptor en la célula hospedadora [200]. La subunidad S2 contiene cuatro regiones conservadas: un péptido de fusión, dos secuencias repetidas heptapeptídicas (HR1 y HR2) y una región transmembrana (TMD). El péptido de fusión de la subunidad S2 permite la fusión de las membranas del virus y la célula hospedadora, lo que facilita la entrada del ARNv en las células [209].

1.2. Ciclo de replicación del SARS-CoV-2

El ciclo de replicación de SARS-CoV-2 inicia con la adherencia de la partícula viral a la membrana de la célula hospedadora a través de la unión de RBD al receptor ACE2 (**Figura 12**). A continuación, la proteína S se escinde en su subunidad S2 por la proteasa de serina transmembrana tipo II (TMPRSS2) presente en células epiteliales del tracto respiratorio, gastrointestinal y próstata [210], [211]. Esta escisión activa a la proteína S, la cual sufre un cambio conformacional que expone el péptido de fusión de esta proteína y permite la fusión entre las membranas del virus y de la célula hospedadora, permitiendo la liberación del ARNv en el citoplasma de la célula. En las células que no poseen cantidades suficientes de TMPRSS2 o esta proteasa está ausente, el virus es internalizado mediante endocitosis mediada por clatrina [212], [213]. Luego de la

acidificación del endosoma, la proteína celular cathepsina L o B cliva la subunidad S2 permitiendo así la fusión de las membranas del virus y de la célula hospedadora.

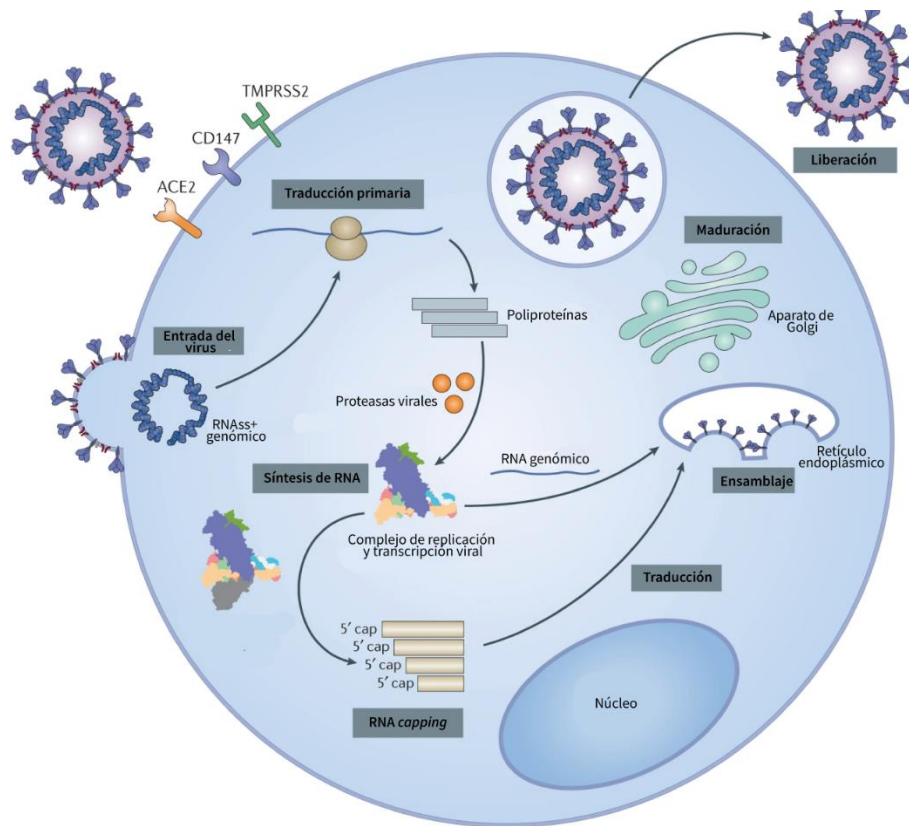


Figura 12. Ciclo de replicación del SARS-CoV-2. Fuente: Yang *et al.* [214].

Cuando el ARNV es liberado en el citoplasma de células infectas, se traducen ORF1a y ORF1ab para producir dos poliproteínas, tal como se explicó anteriormente. A partir de estas poliproteínas, se liberan 16 nsp mediante la escisión proteolítica llevada a cabo por dos proteasas localizadas dentro de nsp3 y nsp5. La proteína no estructural 12, una polimerasa de ARN dependiente de ARN, se ensambla con otras nsp para formar el complejo de replicación y transcripción viral que se ancla en vesículas de doble membrana [215], [216]. Este complejo transcribe una serie de ARNm subgenómicos que luego se traducen en las proteínas estructurales del virus. La nucleoproteína forma un complejo con el ARN genómico, mientras que las proteínas S, E y M se insertan en la envoltura viral en los compartimentos intermedios del RE y el aparato de Golgi [217]. Finalmente, las partículas virales ensambladas se liberan de las células infectadas mediante un mecanismo similar a la exocitosis [218].

1.3. Epidemiología del SARS-CoV-2

Hasta el año 2002, los coronavirus pertenecían a un grupo de virus capaces de causar infecciones leves en humanos, similares a un resfriado común. Sin embargo, la aparición del SARS-CoV en ese año representó un cambio drástico de ese escenario, al provocar un brote de síndrome respiratorio agudo grave con un saldo de 700 muertes a nivel mundial [219]. Una década después, surgió el virus del síndrome respiratorio de Oriente Medio con una tasa de letalidad del 35%, aun mayor [220], [221]. Según algunos expertos, la aparición de un nuevo coronavirus era inevitable con el paso del tiempo. Así fue como en 2019, el SARS-CoV-2 fue identificado como el agente causal de los primeros casos de neumonía viral en Wuhan, China [222].

A principios de la pandemia del SARS-CoV-2, se identificaron dos linajes principales en China, A y B, siendo el linaje B el que más se extendió globalmente y del cual emergieron las variantes del virus [223]. A pesar de las medidas de contención, el virus se propagó rápidamente a otros continentes, con los primeros casos fuera de China detectados en enero de 2020. En Europa, se observó la presencia de la mutación D614G en ciertas cepas circulantes a principios de 2020, la cual se convirtió en la variante predominante, reemplazando a las cepas originales [224]. Esta variante, denominada B.1 se extendió rápidamente, posicionando a Europa en el epicentro de la pandemia, seguida por América del Norte (**Figura 13**) [223], [225].

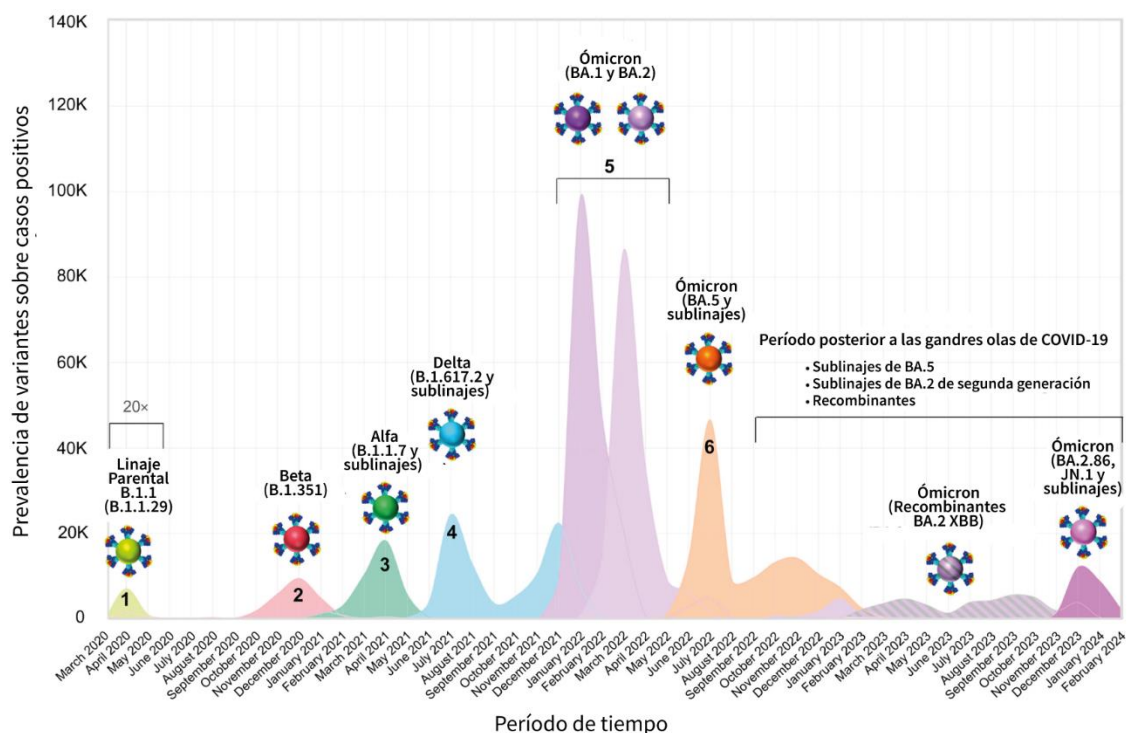


Figura 13. Evolución cronológica y olas epidemiológicas de SARS-CoV-2 desde marzo de 2020 hasta febrero de 2024. Progresión de las principales variantes del virus, escaladas proporcionalmente al número de infecciones durante cada ola. Se incluyen seis olas principales impulsadas por las variantes B.1.1 (linaje parental), Beta (B.1.351), Alfa (B.1.1.7), Delta (B.1.617.2), y dos olas consecutivas de Ómicron (BA.1/BA.2 y BA.5). Posterior a la sexta ola, se observa un período caracterizado por una diversidad de linajes de Ómicron y la emergencia de variantes recombinantes XBB de BA.2. Las variantes de interés que circulan actualmente en la población (BA.2.86 y JN.1) son indicadas al final del período analizado. El corchete negro resalta las infecciones iniciales escaladas por un factor de 20 para mejorar su visibilidad. Adaptado de Chrysostomou *et al.* [226].

A finales del 2020, surgieron tres variantes de preocupación (VOCs) del linaje B.1, que reemplazaron a la cepa original. Estas variantes, Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351) y Gamma (P.1), se caracterizan por la acumulación de mutaciones en la proteína S, particularmente en RBD [227], [228], [229]. La variante Alfa, detectada por primera vez en el Reino Unido, circuló predominantemente en Europa y América del Norte hasta mayo de 2021 [227]. La variante Beta, descrita por primera vez en Sudáfrica, se encontró mayoritariamente en Europa y en la parte sur del continente africano [228]. La tercera VOC, Gamma, fue detectada en Brasil y circuló principalmente en América del Norte y del Sur [229]. Estas variantes impulsaron la tercera ola de COVID-19 a nivel mundial entre marzo y junio de 2021 (**Figura 13**).

La cuarta ola de COVID-19 ocurrió entre julio y octubre de 2021 y fue originada por la variante Delta (B.1.617.2), descrita por primera vez en India (**Figura 13**) [230]. Esta variante se distribuyó rápidamente y reemplazo a las variantes que estaban circulando, convirtiéndose en la única variante circulando en todo el mundo. Esta ola se caracterizó por formas más severas de la enfermedad, principalmente entre grupos como personas no vacunadas y la población joven.

En septiembre de 2021 se identificó una nueva VOC en Sudáfrica en una región donde la variante Delta no estaba circulando mucho, conocida como Ómicron, inicialmente denominada B.1.1.529 y reclasificada como BA.1 [231]. La variante Ómicron BA.1 se esparció rápidamente por todo el mundo, reemplazando a la variante Delta en pocas semanas desde su identificación. Esta variante impulsó la quinta ola de COVID-19 (**Figura 13**).

A medida que la pandemia avanzaba, la variante Ómicron comenzó a evolucionar, dando lugar a múltiples sublinajes, como BA.2, BA.4 y BA.5, que también fueron

clasificadas como VOCs debido a su capacidad para evadir la inmunidad generada por infecciones previas y vacunas [232], [233]. Estas variantes se caracterizaron por un aumento en la transmisibilidad, lo que resultó en un incremento significativo en el número de casos a nivel global, aunque con menor severidad en la enfermedad [234], [235], [236]. Con el correr de los años, emergieron nuevas variantes, como XBB, BQ.1.1 y JN.1, cada una con características genéticas y antigénicas distintivas en comparación con los linajes originales de Ómicron [237], [238].

En mayo de 2023, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró el fin de la emergencia sanitaria de importancia internacional por COVID-19, marcando un punto de inflexión en la gestión global de la pandemia [239]. Esta decisión se basó en la disminución significativa en el número de casos graves y muertes, así como en la alta cobertura de vacunación en muchas regiones del mundo. Sin embargo, la OMS enfatizó que el SARS-CoV-2 continúa siendo un virus peligroso que circula a nivel global y posee potencial para evolucionar, por lo que la vigilancia, el diagnóstico y tratamiento deben mantenerse como prioridades esenciales para la salud pública [240].

En la actualidad, el SARS-CoV-2 se considera una enfermedad endémica, con aumento en la cantidad de casos estacionales, similares a otros virus respiratorios como influenza [241]. Al 28 de junio de 2024, la OMS ha clasificado 2 variantes de interés, BA.2.86 y JN.1, que circulan predominantemente en la población y son derivadas del linaje principal de Ómicron (BA.1) (**Figura 13**) [242].

1.4. Presentación clínica

El SARS-CoV-2, responsable de la enfermedad COVID-19, se transmite principalmente a través del contacto directo con gotas respiratorias expulsadas cuando una persona infectada tose, estornuda o habla [243]. La vía de transmisión del SARS-CoV-2 también puede ser de manera indirecta a través del contacto con manos o superficies contaminadas. Si bien la transmisión por gotas es la ruta dominante, la transmisión por aerosoles y la transmisión fecal-oral también son posibles [244], [245], [246].

La presentación clínica de COVID-19 varía ampliamente entre los individuos infectados, desde casos asintomáticos hasta enfermedades graves que pueden llevar a la muerte [247]. En general, luego del contacto con el virus, existe un periodo de incubación de 4 a 5 días antes del inicio de los síntomas [248], [249]. Los síntomas más comunes incluyen fiebre, tos, dolor de cabeza, fatiga y/o diarrea [250], [251], [252]. Una semana luego del

inicio de los síntomas la enfermedad puede progresar a una forma grave caracterizada por la disnea (dificultad para respirar), resultado de la hipoxemia [253]. En los casos más graves, puede evolucionar hacia una insuficiencia respiratoria progresiva, caracterizada por inflamación y pérdida de tejido pulmonar alveolar [254], [255]. La enfermedad grave también puede producir enfermedades extrapulmonares, como lesiones agudas en el corazón, los riñones y el hígado, arritmias cardíacas, coagulopatías o síntomas gastrointestinales [256]. Al igual que ocurre con otras enfermedades virales, los pacientes con enfermedades preexistentes, ancianos e inmunocomprometidos poseen un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad grave [257], [258].

A pesar de que la mayoría de los individuos infectados se recupera luego de unos días o semanas, algunas personas padecen post-COVID-19 (también conocido como “*long COVID-19*”), una condición en donde los síntomas persisten por más de 3 meses [259]. Las manifestaciones de esta condición son heterogéneas y multisistémicas, pudiendo afectar cualquier sistema del cuerpo dependiendo del paciente (inmune, hematológico, pulmonar, cardiovascular, etc.) [260].

1.5. Tratamiento de la infección

El tratamiento de la infección por SARS-CoV-2 varía según la etapa de la enfermedad y la severidad de los síntomas [261]. En las etapas tempranas, cuando predomina la replicación viral, los antivirales desempeñan un papel crucial al inhibir el ciclo de replicación del virus. Por otro lado, en etapas avanzadas de la enfermedad, cuando la respuesta inmune exacerbada contribuye al daño pulmonar y sistémico, los inmunomoduladores se convierten en la opción terapéutica principal, enfocándose en mitigar la inflamación excesiva y sus consecuencias clínicas.

Entre los antivirales desarrollados para el tratamiento de la infección se destacan dos categorías principales: moléculas pequeñas y antivirales basados en anticuerpos. Tres moléculas pequeñas, remdesivir, nirmatrelvir/ritonavir y molnupiravir, han recibido la aprobación o autorización de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para el tratamiento de COVID-19 [262]. Muchas de estas moléculas no fueron desarrolladas específicamente para SARS-CoV-2, sino que previamente se habían estudiado o aprobado para otros agentes antivirales. Por ejemplo, el remdesivir fue inicialmente desarrollado para tratar el virus del Ébola y otros virus de ARN [263], [264]. Esta molécula, un análogo de nucleótido, impide la replicación viral al inhibir la ARN

polimerasa viral [262]. Por su parte, el nirmatrelvir/ritonavir actúa como inhibidor de la principal proteasa viral, impidiendo el procesamiento de las poliproteínas virales necesarias para la replicación, mientras que molnupiravir, un análogo de ribonucleósido, induce errores durante la replicación del ARN viral, llevando al virus a un estado de mutagénesis viral letal [265], [266].

En cuanto a los antivirales basados en anticuerpos neutralizantes, se han explorado diversas estrategias terapéuticas, incluyendo el uso de plasma de convalecientes, suero hiperinmune y anticuerpos monoclonales. El plasma de convalecientes y el suero hiperinmune contienen anticuerpos policlonales generados por individuos que se han recuperado de la infección, los cuales pueden ofrecer inmunidad pasiva al paciente [267], [268], [269]. Sin embargo, su efectividad depende de factores como la carga viral del donante y el momento de administración [262]. Los mAbs dirigidos contra la proteína S representaron estrategia crucial para combatir la enfermedad. Estos mAbs, desarrollados a partir de anticuerpos neutralizantes de pacientes convalecientes o ratones humanizados inmunizados, bloquean la entrada viral y promueven la eliminación del virus mediante mecanismos como la citotoxicidad o la fagocitosis dependiente de anticuerpos [270]. La FDA y la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos (EMA) otorgaron autorizaciones de uso de emergencia a varios mAbs, incluidos bamlanivimab, etesevimab, casirivimab, entre otros, para su uso en pacientes ambulatorios [271], [272], [273]. Sin embargo, la efectividad de estos anticuerpos se vio limitada por la aparición de múltiples mutaciones en la proteína S, especialmente en variantes como Delta y Ómicron, lo que llevó a la pérdida de eficacia y la interrupción de estas terapias [274].

En este contexto, numerosos grupos de investigación han desarrollado Nbs como una alternativa más eficiente, versátil y económica al uso de los mAbs. La mayoría de los Nbs desarrollados están dirigidos contra RBD. Algunos de estos Nbs actúan bloqueando la interacción del virus con ACE2, mientras que otros se unen a epítopes conservados, lo que les permite mantener su capacidad neutralizante frente a variantes emergentes [275], [120], [276], [277]. Sin embargo, la mayoría de los Nbs de primera generación, desarrollados contra la cepa original del virus, no fueron capaces de neutralizar las subvariantes de Ómicron debido a las numerosas mutaciones acumuladas en la proteína S [278]. Para superar estas limitaciones, se llevaron a cabo diversas modificaciones estructurales en los Nbs, como la generación de formatos biespecíficos, multivalentes o

fusionados a la región Fc de IgG o IgA humana. Estas estrategias no solo han ampliado su espectro de acción, sino que también mejoraron significativamente su actividad neutralizante y eficacia terapéutica [120], [277], [279], [280], [281], [282].

Además del RBD, otras regiones de la proteína S han sido exploradas como blancos para el desarrollo de Nbs. El dominio NTD representa una de estas alternativas, aunque los Nbs dirigidos a esta región generalmente muestran una menor actividad neutralizante en comparación con aquellos dirigidos al RBD [283]. Por ejemplo, los Nbs SR01 y SR02 han mostrado actividad neutralizante frente a múltiples variantes, incluyendo Alfa, Beta y Ómicron, aunque con potencias variables (IC_{50} entre 3.77 y 300 nM en sus formatos fusionados a Fc) [284]. La subunidad S2 de la proteína S también se presenta como un blanco prometedor, particularmente debido a su naturaleza conservada entre las variantes del SARS-CoV-2 que les confiere una amplia actividad neutralizante [284].

2. Objetivos

Teniendo en cuenta que el SARS-CoV-2 continúa circulando a nivel global y representa un riesgo particular para poblaciones vulnerables, el desarrollo de tratamientos antivirales efectivos sigue siendo una prioridad. Las terapias actuales, aunque efectivas, han mostrado limitaciones frente a variantes emergentes con capacidad de evadir la respuesta inmune. En este contexto, resulta crucial explorar nuevas estrategias terapéuticas que permitan prevenir y tratar la infección de manera eficiente. Por este motivo, el objetivo principal de este trabajo consistió en **desarrollar Nbs capaces de neutralizar la infección causada por SARS-CoV-2 para ser utilizados como moléculas antivirales.**

Los objetivos específicos de este trabajo fueron:

- 1) Expresar y purificar de manera recombinante las proteínas S y la subunidad RBD de SARS-CoV-2.
- 2) Generar una biblioteca inmune de Nbs contra SARS-CoV-2.
- 3) Seleccionar y caracterizar Nbs que reconozcan de manera específica a las proteínas S y/o RBD.
- 4) Analizar la capacidad de los Nbs seleccionados o combinaciones de los mismos de neutralizar la infección *in vitro* causada por la cepa original de SARS-CoV-2 y sus variantes.
- 5) Determinar los sitios de unión de los Nbs seleccionados a las proteínas S o RBD.

3. Resultados

3.1. Producción y purificación de las proteínas recombinantes S y la subunidad RBD de SARS-CoV-2

Los plásmidos de expresión que codifican para la proteína S-2P del SARS-CoV-2 fueron amablemente cedidos por el *Vaccine Research Center* (VRC, NIH) y la *Icahn School of Medicine at Mount Sinai* (ISMMS). Además, el vector que expresa los residuos 319 a 541 de RBD también fue gentilmente proporcionado por ISMMS. Ambos vectores de la proteína S incluyen una delección del dominio transmembrana para mejorar su solubilidad, así como 2 mutaciones estabilizantes (K986P y V987P). Sin embargo, presentan algunas diferencias en el diseño de optimización para mejorar la estabilidad de S: el vector VCR sustituye el sitio de clivaje polibásico por la secuencia GSAS, mientras que el vector ISMMS reemplaza la secuencia RRAR por un único residuo de alanina [209], [285]. A su vez, los vectores difieren en motivos de trimerización: el vector VRC utiliza el motivo de trimerización T4 fibritina, mientras que el vector ISMMS emplea un dominio de trimerización T4 foldon.

Los plásmidos se transfectaron en células adherentes HEK-293T, utilizando PEI y las proteínas recombinantes se purificaron desde el sobrenadante mediante IMAC. Las fracciones resultantes de la purificación se sometieron a SDS-PAGE para verificar la integridad y pureza de las proteínas recombinantes (**Figura 14**). La proteína S, presente en las eluciones de la purificación, migró como una única banda de aproximadamente 170 kDa, correspondiente al monómero de esta glicoproteína (**Figura 14A, flecha roja**); mientras que en la purificación de RBD se visualizó una única banda de aproximadamente 35 kDa en las fracciones correspondientes, consistente también con el PM esperado para esta subunidad (**Figura 14B, flecha roja**).

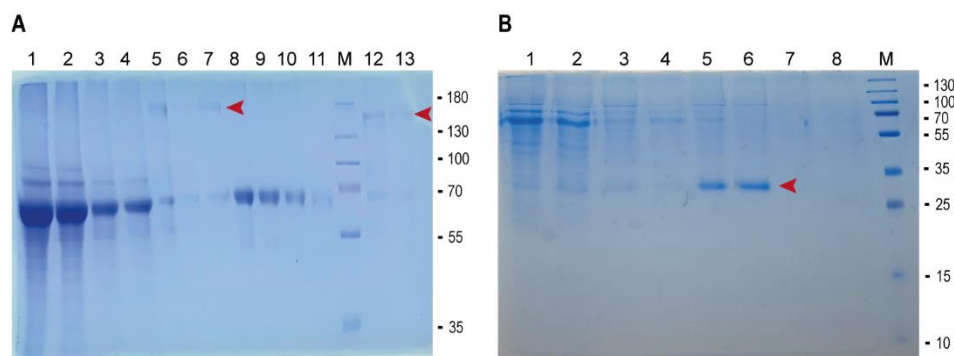


Figura 14. Purificación de S-2P y RBD con resina de Ni-NTA. (A) SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de la purificación de las proteínas S-2P de los dos vectores utilizados. Calle 1: fracción no unida a la resina. Calles 2-4: lavados. Calles 5-7: eluciones construcción VRC. Calles 8-11: curva

patrón BSA para cuantificación. Calles 12-23: eluciones construcción ISMM. (B) SDS-PAGE teñido con azul de *Coomassie* de la purificación de la proteína RBD. Calle 1: fracción no unida a la resina. Calles 2-4: lavados. Calles 5-8: eluciones. M: marcador de PM en kDa.

El vector del VRC que codifica la proteína S-2P produjo cantidades significativamente mayores de proteína en comparación con el vector de ISMMs, que codifica una proteína ligeramente diferente (**Tabla 2**). Por esta razón, se utilizaron los plásmidos cedidos por el primer lugar mencionado para escalar la producción de ambas proteínas.

Tabla 2. Rendimientos de las proteínas recombinantes purificadas.

Proteína	Fuente	Rendimiento (mg/l)
S-2P	VRC	0,36
S-2P	ISMM	0,1
RBD	VRC	0,8

3.2. Inmunización y evaluación de la respuesta inmune

Una llama de un año, seronegativa para anticuerpos humanos contra SARS-CoV-2, fue inmunizada según el cronograma descrito (**Figura 15A**). Debido al bajo rendimiento en la expresión de la proteína S-2P utilizando el sistema adherente HEK-293T, y considerando la cantidad de proteína recombinante necesaria para inducir una buena respuesta inmunitaria en llamas, decidimos usar otra fuente de proteína S, gentilmente suministrada por el Dr. Yves Durocher (NRCC, Canadá) y expresada en células CHO, para los dos últimos refuerzos.

Después de tres inmunizaciones, la llama desarrolló una fuerte respuesta inmune contra las proteínas S-2P y RBD. Esta respuesta fue cuantificada mediante ELISA, revelando un título máximo de anticuerpos IgG de 262.144 para ambos antígenos en el día 32 post inmunización (PID) (**Figura 15B**). A su vez, los anticuerpos de la llama mostraron una fuerte capacidad neutralizante, medida por un ensayo de neutralización utilizando pseudovirus (pVNT) que expresan la proteína S correspondiente a la cepa WT de SARS-CoV-2 (**Figura 15B y C**). La actividad neutralizante de estos anticuerpos aumentó después de cada inmunización, alcanzando su punto máximo con una dilución de 1:1296 de una muestra de suero tomada en el PID 32. Después de confirmar las respuestas óptimas de anticuerpos, la llama descansó durante un mes para promover el proceso de hipermutación y mejorar la afinidad de la respuesta humoral. Finalmente, la llama

recibió una cuarta inmunización en el PID 50 y, cuatro días después, se extrajo sangre para producir la biblioteca de Nbs.

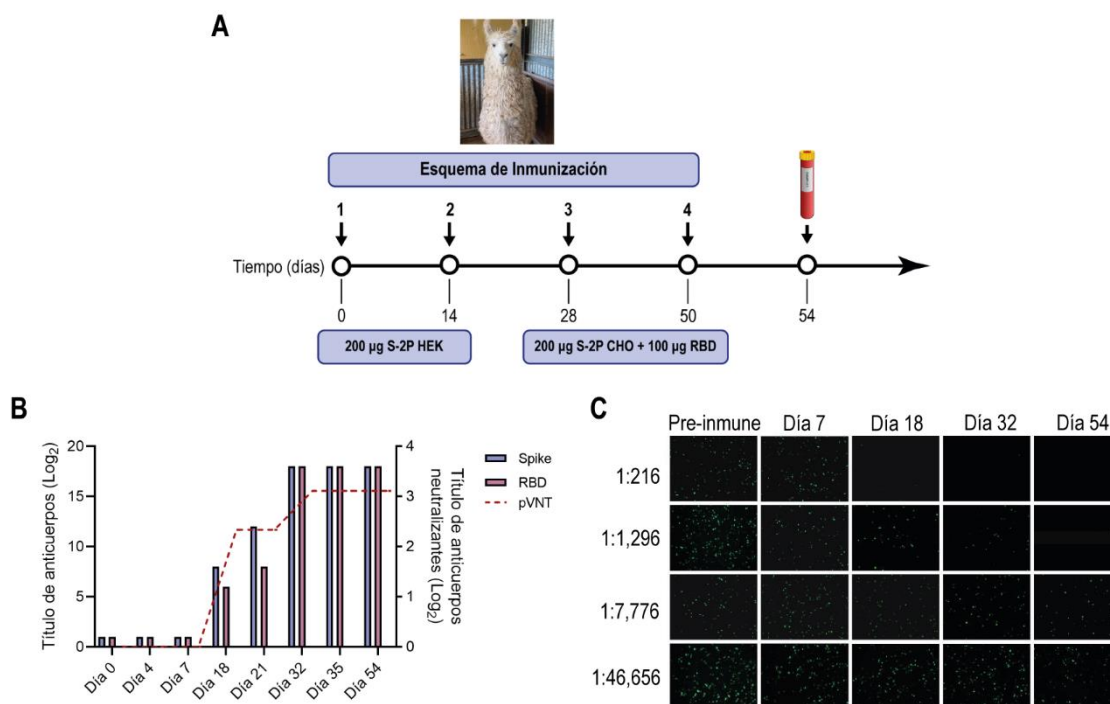


Figura 15. Inmunización y evaluación de la respuesta inmune. (A) Esquema de inmunización: una llama se inyectó intramuscularmente con 200 µg de la proteína recombinante S-2P producida en HEK-293T los días 0 y 14 y en los días 28 and 56 con 200 µg de S-2P producida en células CHO y 100 µg de RBD emulsionadas en adyuvante de Freund. (B) Título total de anticuerpos IgG determinado por ELISA (barras) y título de anticuerpos neutralizantes determinado por pVNT a los 4 y 7 días luego de cada inmunización (líneas punteadas). (C) Figura ilustrativa de la actividad neutralizante del suero de llama determinado por pVNT. La capacidad neutralizante aumentó después de cada inmunización y se correlacionó con la disminución del número de células fluorescentes.

3.3. Construcción de la biblioteca de Nbs

A partir de 200 ml de sangre de la llama se aislaron $4,56 \times 10^8$ PBMC. El ARN total proveniente de 1×10^6 PBMC fue purificado mediante columnas de sílica comerciales y analizado por electroforesis en gel de agarosa 1% en TBE para corroborar su integridad (**Figura 16A**). Posteriormente fue cuantificado por absorbancia a 260 nm, considerando que una $DO_{260}=1$ corresponde a 40 µg/ml de ARN. A partir de 9 µg de ARN total se generó el ADN copia para amplificar las secuencias codificantes de los Nbs. En una primera PCR se obtuvieron dos fragmentos distintos: uno de aproximadamente 900 pb, que corresponde a la región VH de los anticuerpos convencionales, y otro de aproximadamente 700 pb, que refiere a la región variable de los anticuerpos de cadena pesada, desde los cuales se obtienen los Nbs (**Figura 16B**). La diferencia en el PM se debe

al dominio CH1 ubicado entre el dominio variable y el dominio CH2, que poseen únicamente el primer tipo de anticuerpos mencionado. El fragmento de PCR de 700 pb se cortó y purificó de un gel de agarosa y se utilizó como templado en una PCR anidada para amplificar únicamente las secuencias VHHs. A partir de la misma se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 400 pb, los cuales se cortaron nuevamente del gel y se purificaron (**Figura 16C**). Esta PCR anidada introdujo sitios de restricción de la enzima SspI en los extremos 5' y 3' de los amplicones.

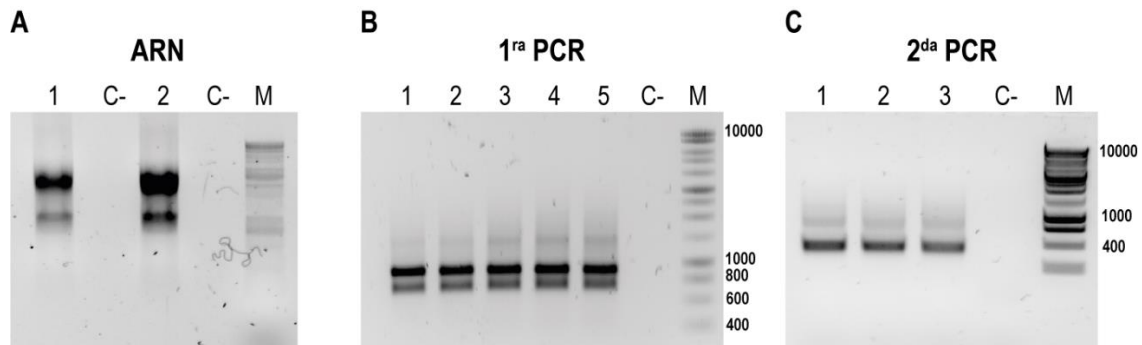


Figura 16. (A) Gel obtenido luego de la purificación del ARN de los linfocitos de la llama inmunizada con las proteínas S-2P y RBD. (B) Amplificación del ADN mediante una primera PCR donde la banda superior corresponde al fragmento de las regiones variables más la región CH1 de anticuerpos convencionales y la banda inferior a las regiones variables de los anticuerpos de cadena pesada. (C) Segunda PCR donde se amplifican específicamente las regiones VHHs.

El ADN purificado de la segunda PCR se utilizó como inserto del vector fagémido pMECS-GG en la reacción de *Golden Gate*. Los productos de ligación fueron transformados en bacterias TG1 electrocompetentes, obteniendo una biblioteca inmune de $1,8 \times 10^9$ transformantes independientes. Todos los clones analizados por *colony* PCR (54/54) tenían un fragmento de ~700 pb, lo que indica la incorporación de la secuencia codificante de un Nb y una eficiencia de ligación del 100% (**Figura 17**).

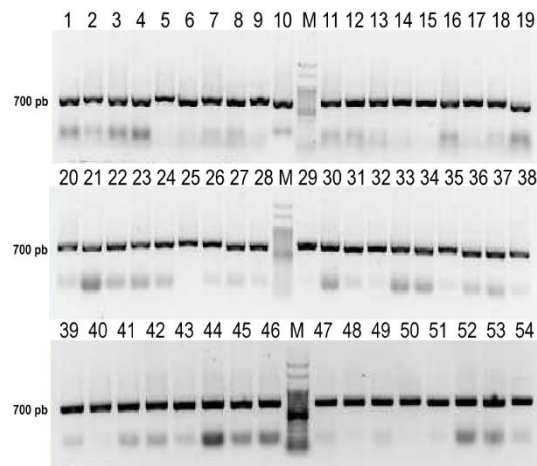


Figura 17. Amplificación mediante *colony* PCR de clones individuales de la biblioteca de la llama inmunizada con las proteínas S-2P y RBD.

En el laboratorio se contaba con la presencia de otra biblioteca de Nbs, obtenida previamente luego de inmunizar una llama con la vacuna para coronavirus bovino (BCoV) Mebus (**Figura 18A**). La misma desarrolló una fuerte respuesta de anticuerpos contra las proteínas de SARS-CoV-2 S-2P y RBD (**Figura 18B**). Sin embargo, los anticuerpos policlonales no neutralizaron el SARS-CoV-2 mediante pVNT, incluso cuando las proteínas S de ambas cepas muestran una considerable similitud de secuencia (44,4%) y una semejanza en la estructura general (**Figura 18C, D y E**).

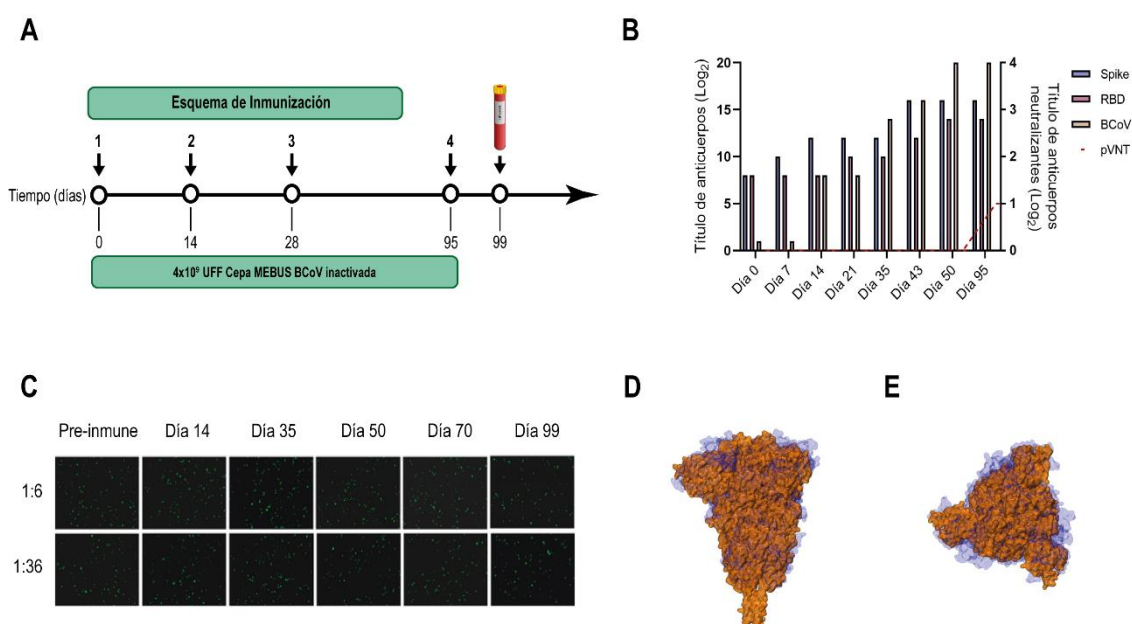


Figura 18. Inmunización de la llama con BCoV Mebus inactivado y respuesta inmune. (A) Esquema de inmunización: una llama fue inyectada intramuscularmente en los días 0, 14, 28 y 95 con 4×10^9 UFF de la cepa inactivada de BCoV Mebus en adyuvante de Freund. (B) Título total de IgG determinado por ELISA y de anticuerpos neutralizantes para las proteínas BCoV y SARS-CoV-2 RBD y S-2P. (C) Imagen que muestra la actividad no neutralizante de los sueros de una llama inmunizada con BCoV Mebus contra SARS-CoV-2 determinada por pVNT. Vista frontal (D) y vista superior (E) de la superposición de las estructuras de la proteína S de SARS-CoV-2 (naranja) y BCoV Mebus (azul) utilizando el software VMD.

3.4. Selección de Nbs específicos para SARS-CoV-2 S-2P y RBD

Ambas bibliotecas se sometieron a tres rondas consecutivas de biopaneos para seleccionar Nbs específicos para las proteínas S-2P y RBD. En total, se analizaron 190 colonias para evaluar la especificidad de los Nbs para las proteínas antigénicas mediante ELISA de fagos recombinantes (rPE) y ELISA de extractos periplásmicos (PEE).

Después del biopaneado con la proteína S-2P, se identificaron 74 clones positivos mediante rPE, de los cuales 45 también reconocieron RBD. Además, mediante PEE se detectaron 62 clones específicos para S-2P, y dentro de este grupo, 27 fueron capaces de unirse también a RBD. Mientras que algunos clones demostraron la capacidad de reconocer tanto la proteína S-2P como RBD, otros se unieron exclusivamente a la proteína S-2P sin interactuar con este dominio. Este último grupo representa un conjunto interesante de Nbs, al estar dirigidos a epítopes en regiones de esta proteína que no participan en la interacción con el receptor ACE2, con ventajas claves para el desarrollo de moléculas antivirales.

Por otro lado, cuando se realizó el biopaneado con la proteína RBD, los análisis mediante rPE y PEE identificaron 46 y 53 clones positivos, respectivamente. Adicionalmente, se obtuvieron un total de 18 clones positivos de la biblioteca BCoV Mebus después del biopaneado con S-2P y el *screening* de clones con S-2P y RBD en rPE.

Se transformaron 72 clones positivos en bacterias *E. coli* DH5 α y se enviaron para secuenciación. Después del análisis de secuencias, se detectaron 43 Nbs únicos de la biblioteca SARS-CoV-2 y 2 Nbs de la biblioteca Mebus (Mebus Nb-10 y Mebus Nb-25) (Figura 19).

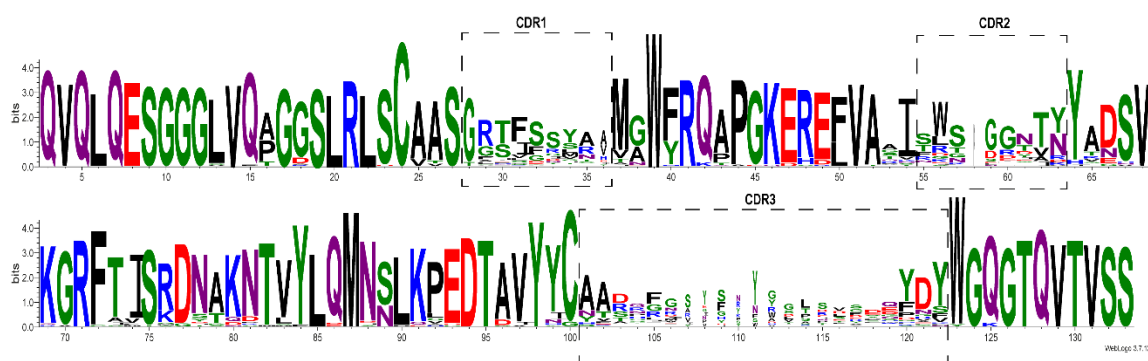


Figura 19. Logotipo de secuencias del repertorio diverso de Nbs contra SARS-CoV-2 obtenido. Representación en logotipo de alineaciones múltiples de secuencias de aminoácidos de los 43 Nbs únicos seleccionados después del *biopanning* con las proteínas RBD o S-2P. La altura de los símbolos indica la frecuencia relativa de cada aminoácido en esa posición.

3.5. Caracterización *in vitro* de los Nbs

3.5.1. Análisis filogenético de las secuencias de Nbs

A partir de las secuencias nucleotídicas de los Nbs seleccionados de la biblioteca inmune contra SARS-CoV-2 se construyó un árbol filogenético utilizando el programa MEGA

versión 11 (**Figura 20**). Este análisis permitió clasificar las secuencias de Nbs en cuatro grupos principales (A, B, C y D, diferenciados en la siguiente tabla en rojo, naranja, azul y rosa, respectivamente). Sin embargo, la mayoría de las secuencias no pudo ser agrupada debido a una gran variabilidad de las mismas. Los Nbs presentes en los 4 grupos mencionados se seleccionaron con uno de los dos antígenos (S-2P o RBD), lo que indica una buena estrategia de selección.

El grupo A se sustentó con un valor de *bootstrap* del 98% y constituyó un grupo monofilético de Nbs dirigidos a RBD (Nb-27, Nb-143, Nb-106, Nb-104 y Nb-110). Estos comparten una homología de aminoácidos que varía entre el 69% al 91%. Todos los Nbs en este grupo poseen un CDR3 de 12 AA de longitud, excepto el Nb-110 que tiene un CDR3 más largo (17 aminoácidos).

El grupo B, con un valor de *bootstrap* del 100%, incluye cuatro Nbs que reconocen RBD y muestran un CDR3 casi idéntico, lo que sugiere que pertenecen a la expansión clonal de la misma célula B. Por otra parte, el grupo C consiste en cinco Nbs con CDR3 de longitudes similares y una homología promedio del 91%. El grupo D tuvo un bajo valor de *bootstrap* del 56%, sin embargo, la homología fue alta (82,4% a 91,2%) y todos los Nbs tenían un CDR3 de 19 AA de longitud.

Los resultados del análisis *IMGT/V-QUEST* mostraron un uso predominante del gen y alelo V3S5301 para los grupos A y B, mientras que la mayoría de los genes V para los grupos C y D fueron V3-301 (**Figura 20**). Se obtuvo más variabilidad en el uso de genes V mediante el análisis *IMGT/DomainGapAlign*. Al analizar los segmentos J, el alelo J4*01 se utilizó en todos los grupos según el programa *V-QUEST*. No obstante, para el programa *DomainGapAlign*, el alelo J6*01 fue predominante para los grupos A y B, y J4*01 para los grupos C y D. Los segmentos D presentan gran variabilidad según el programa *V-QUEST*. Solo el Nb-30 tiene un alelo diferente (en este caso, D3*02).

El CDR3 de los Nbs seleccionados promedió 15 (12–20) AA de longitud y mostró una alta diversidad de secuencias. Considerando las secuencias de los Nbs y su origen germinal y filogenético, podemos afirmar que al analizar una gran biblioteca de Nbs ($1,8 \times 10^9$ transformantes independientes) y utilizando dos antígenos de selección, es posible obtener Nbs con alta variabilidad de secuencias y diverso origen.

Árbol filogenético NJ	Nb-ID	IMGT/V-QUEST			IMGT/DomainGapAlign		Largo CDR3	Secuencia CDR3	pI	Antígeno de Biopaneo	Screening PE/PEE (S-2P)	Screening PE/PEE (RBD)	EC ₅₀ (nM) (Spike)	EC ₅₀ (nM) (RBD)
		V-GENE	D-GENE	J-GENE	V-GENE	J-GENE								
SARS-CoV-2	BCoV	10M	3S53*01	4*01	4*01	3S3*01	4*01	17	AAAYAPYTDYHPVEYVY	7.09	RBD	+ND	+ND	174.7
	106	106	3S53*01	6*01	4*01	3S53*01	6*01	12	YARNFVGRNPDV	7.96	RBD	+/+	+/+	3.79
	110	110	3S53*01	6*01	4*01	3-3*01	4*01	17	AVARSWDLDFENGVDY	6.77	RBD	+/+	+/+	1.93
	104	104	3S53*01	7*01	4*01	3S53*01	6*01	12	YARNFVGHNDV	7.98	RBD	+/+	+/+	0.38
	143	143	3S53*01	3*01	4*01	3S53*01	6*01	12	YARNFIGDNDV	7.97	RBD	+/+	+/+	ND
	27	27	3S53*01	6*01	4*01	3S53*01	6*01	12	YARNFVGDDFNL	7.83	Spike	+/+	+/+	0.35
	103	103	3S53*01	4*01	4*01	3S53*01	6*01	11	NADHFLDQFDS	6.12	RBD	+/+	+/+	ND
	50	50	3S53*01	4*01	4*01	3S53*01	6*01	11	NADHFLDQFDS	5.71	Spike	+/+	+/+	ND
	96	96	3S53*01	4*01	4*01	3S53*01	6*01	11	SADHFLDQFDS	6.70	Spike	+/+	+/+	ND
	102	102	3S53*01	4*01	4*01	3S53*01	6*01	11	SADHFLDQFDS	7.05	RBD	+/+	+/+	ND
	32	32	3S53*01	6*01	7*01	3S3*01	4*01	15	NEARVYDSNWYPRDY	8.98	Spike	+/+	-/-	0.012
	30	30	3S53*01	3*02	7*01	3S3*01	4*01	11	NYHNSYVGSY	7.81	Spike	+/+	+/+	5.84
	37	37	3S53*01	2*01	7*01	3S3*01	4*01	11	NYHNYVGLDF	6.64	Spike	+/+	+/+	3.36
	43	43	3S53*01	2*01	4*01	3S53*01	4*01	13	HFRQIRANAHVY	8.64	Spike	+/+	+/+	0.47
	48	48	3S53*01	2*01	4*01	3S53*01	4*01	13	HFRQIRAIADVY	8.98	Spike	+/+	+/+	0.56
	125	125	3S53*01	2*01	4*01	3S53*01	6*01	10	YARDLLQHPF	6.00	RBD	+/+	+/+	12.04
	89	89	3S53*01	6*01	4*01	3S53*01	2*01	11	AAKTRGVYGTN	7.54	Spike	+/+	+/+	14.65
	35	35	3-3*01	4*01	4*01	3S1*01	4*01	15	ASDLRMVEGDWYGGY	6.27	Spike	+/+	-/-	23.77
	73	73	3-3*01	2*01	4*01	3-3*01	2*01	18	ARISRPYDSGRKVGDIAY	7.81	Spike	+/+	-/-	ND
	76	76	3-3*01	2*01	4*01	3-3*01	4*01	18	ATDPGNFGLPYSELYNY	6.81	Spike	+/+	+/+	ND
	42	42	3-3*01	6*01	4*01	3S2*01	4*01	15	AARNGYSPFVRSYDY	6.81	Spike	+/+	-/-	ND
	53	53	3-3*01	8*01	4*01	3-3*01	4*01	15	AAGGRISNEGFKPDY	8.98	Spike	+/+	-/-	103.6
	56	56	3-3*01	2*01	4*01	3-3*01	4*01	22	AARYAAGSPYWKLTTPSEYDY	8.50	Spike	+/+	-/-	ND
	44	44	3-3*01	4*01	4*01	3-3*01	4*01	19	AADPFRRVIAYSDPKRYSY	6.64	Spike	+/+	+/+	50.44
	136	136	3-3*01	2*01	4*01	3-3*01	4*01	18	AAEGIRYSSTRADFVNY	7.80	RBD	+/+	+/+	174.7
	71	71	3-3*01	1*01	4*01	3-3*01	4*01	17	AVAREWSDLDFRDGYDY	7.80	Spike	+/+	+/+	0.14
	108	108	3-3*01	6*01	4*01	3-3*01	4*01	11	AATGDGGSYDY	7.01	RBD	+/+	+/+	ND
	33	33	3-3*01	5*01	4*01	3S3*01	4*01	18	AVTRRRFVTLRVPDDYDK	8.99	Spike	+/+	-/-	0.025
	47	47	3-3*01	2*01	4*01	3-3*01	2*01	18	AATRRRYHTLRVSGDYDN	6.71	Spike	+/+	-/-	ND
	54	54	3-3*01	2*01	4*01	3-3*01	4*01	17	AASQFGSGADYSEQYDY	7.94	Spike	+/+	-/-	ND
	31	31	3-3*01	2*01	4*01	3S5*01	4*01	17	ATSQFGSGTSDSEQYDY	8.55	Spike	+/+	-/-	ND
	40	40	3-3*01	4*01	4*01	3S5*01	4*01	17	ATSQFGSGTSDSEQYDY	8.55	Spike	+/+	-/-	1.06
	85	85	3-3*01	4*01	4*01	3-3*01	4*01	17	ATSQFGSGTSDSEQYDY	8.55	Spike	+/+	-/-	0.81
	100	100	3-3*01	4*01	4*01	3-3*01	4*01	17	ATSQFGSGTSDSKQYDY	8.93	RBD	+/+	+/+	1.92
	29	29	3-3*01	2*01	4*01	3S1*01	4*01	18	AASSWDSRGSNVYHYDY	8.49	Spike	+/+	-/-	0.05
	45	45	3-3*01	2*01	4*01	3-3*01	4*01	18	AASSRDSRGTSTYASYDY	8.98	Spike	+/+	-/-	1.84
	46	46	3-3*01	5*01	4*01	3-3*01	4*01	20	AATALGYRYASLESREYRY	7.79	Spike	+/+	-/-	0.38
	78	78	3-3*01	5*01	4*01	3-3*01	4*01	20	AATGLGYRYAVLESREYRY	8.52	Spike	+/+	-/-	0.53
	51	51	3-3*01	1*01	4*01	3-3*01	4*01	19	AARYPGKWGLPTDTRFDF	8.85	Spike	+/+	-/-	4.42
	105	105	3-3*01	2*01	4*01	3-3*01	4*01	18	AADRGESVYVSRPSEYTY	6.02	RBD	+/+	+/+	1.08
	59	59	3-3*01	4*01	4*01	3-3*01	4*01	20	AADKMGYYRDAALASWYDY	8.55	Spike	+/+	-/-	ND
	34	34	3-3*01	1*01	4*01	3S3*01	4*01	19	ATDPGNFGLPNSLEFNY	6.45	Spike	+/+	+/+	ND
	39	39	3-3*01	5*01	4*01	3S3*01	4*01	19	CAADPGNFGVPIEYFMFDY	5.28	Spike	+/+	+/+	0.14
	145	145	3-3*01	5*01	4*01	3-3*01	4*01	19	CAADPGNFGVPIEHFMYDY	7.96	RBD	+/+	+/+	0.81

Figura 20. Análisis filogenético de los Nbs seleccionados después del *biopanning* de dos bibliotecas de Nbs. Las columnas 1 y 2 muestran el árbol filogenético obtenido con la identificación de cada Nb, respectivamente. El origen germinal según los programas *IMGT/V-QUEST* (columnas 3 a 5) e *IMGT/DomainGapAlign* (columnas 6 y 7) muestran el segmento génico (V), el segmento génico de diversidad (D) y el gen de unión (J) para cada Nb. Se utilizan los mismos colores para el origen VDJ similar. La longitud y composición del CDR3 se representan en las columnas 8 y 9, respectivamente. Los CDR3 marcados en negrita corresponden a los Nbs seleccionados para una caracterización adicional. Los valores del punto isoelectrico (pI) se muestran en la columna 10. El antígeno utilizado para el *panning* y la unión a las proteínas SARS-CoV-2 se representa en las columnas 11 a 13. La actividad de unión de cada Nb a las proteínas S-2P y RBD (concentración efectiva media, EC₅₀ en nM) se muestra en las columnas 14 y 15. ND: no determinado. Neg: negativo.

3.5.2. Expresión y purificación de los Nbs

Todos los Nbs se expresaron a baja escala (100 ml de cultivo) y purificaron mediante IMAC. Todas las fracciones obtenidas durante la purificación se sometieron a SDS-PAGE y tinción con azul de *Coomassie* para evaluar la eficiencia del proceso y la pureza de los Nbs (**Figura 21**). En los geles se pueden observar bandas de aproximadamente 15 kDa en las fracciones de elución, correspondientes al PM esperado de los Nbs, que indica una purificación exitosa de estas moléculas.

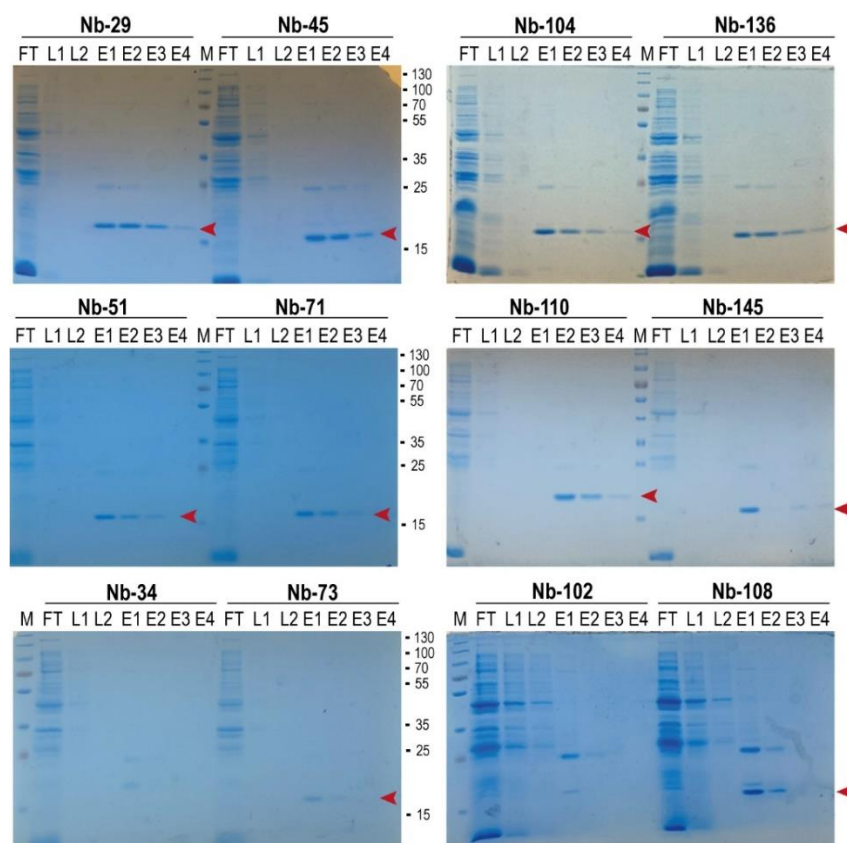


Figura 21. Expresión y purificación de los Nbs. SDS-PAGE teñidos con azul de *Coomassie* de la purificación de Nbs representativos cuya expresión fue alta (panel superior), media (panel del medio) y baja (panel inferior). FT: fracción no unida a la resina. L1 y L2: lavados. E1, E2, E3 y E4: eluciones. M: marcador de PM en kDa.

3.5.3. Análisis de la capacidad neutralizante de los Nbs seleccionados

Veintinueve Nbs, cuyo nivel de expresión varió de 1 a 9,2 mg/l, fueron seleccionados para continuar con su caracterización. Con el objetivo de analizar si los Nbs seleccionados poseen la capacidad de bloquear la entrada del SARS-CoV-2 a la célula, se puso a punto en el laboratorio el pVNT. Un análisis preliminar identificó 15 posibles Nbs neutralizantes que inhiben la infección por pseudovirus SARS-CoV-2 de manera dependiente de la dosis, con valores de concentraciones inhibitorias medias (IC_{50}) que van desde 3,36 nM hasta 79,04 nM. Entre estos, tres Nbs seleccionados con la proteína RBD y cinco Nbs seleccionados contra la proteína S-2P mostraron una fuerte actividad neutralizante y fueron elegidos para estudios adicionales (**Figura 22**). El Nb 10M, seleccionado de la biblioteca BCoV Mebus, aunque fue capaz de reconocer el dominio RBD mediante ELISA, no mostró ninguna propiedad neutralizante.

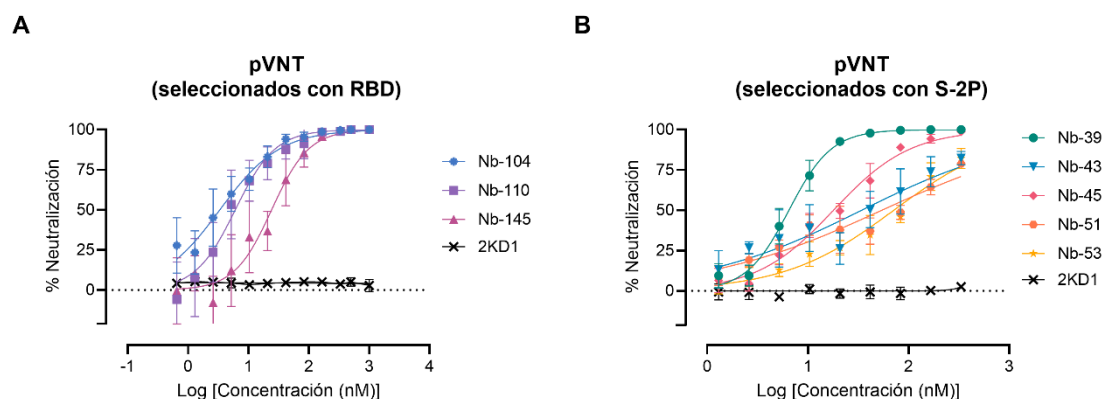


Figura 22. Actividad neutralizante de los Nbs contra la cepa WT de SARS-CoV-2. La potencia de neutralización de 8 Nbs se calculó en base a los resultados de pVNT. (A) Los símbolos y líneas azules, violetas y magentas denotan Nb-104, Nb-110 y Nb-145 seleccionados con la proteína RBD de SARS-CoV-2, respectivamente; (B) Los símbolos y líneas verdes, celestes, rosas, naranjas y amarillos representan los Nbs seleccionados contra la proteína S-2P. Los símbolos y líneas negras denotan un Nb de control anti-rotavirus (2KD1). Las curvas de inhibición se realizaron con los Nbs seleccionados en diluciones seriadas dos veces. Después de 48 horas, la señal de GFP de dos imágenes por pozo se cuantificó usando ImageJ/Fiji y se normalizó al número de células positivas para GFP en los pozos que contenían solo pseudovirus. Las curvas de inhibición se presentan en dilución transformada logarítmicamente con valores de IC_{50} para cada Nb. Cada experimento se replicó tres veces. El IC_{50} se calculó ajustando la inhibición de los Nbs diluidos en serie a una curva de respuesta sigmoidea a la dosis.

La capacidad de neutralización de los Nbs seleccionados también se determinó mediante ensayos de neutralización viral (VNA), aplicando dos metodologías diferentes, inmunofluorescencia (IF) y ensayo de neutralización por reducción de placas (PRNT), y dos aislamientos WT: hCoV-19/Argentina/PAIS-C0102/2020 (que contiene la mutación D614G) que circulaba en Argentina, y hCoV-19/USA-WA1/2020 de EE.UU. Los resultados, resumidos en la **Tabla 3**, muestran las capacidades de neutralización exhibidas por los Nbs seleccionados. Es importante mencionar que, aunque se puede observar una diferencia en los valores de concentraciones inhibitorias 90 (IC_{90}) para cada ensayo, los mismos Nbs fueron identificados como neutralizantes en dos pruebas diferentes, realizadas por dos laboratorios independientes y utilizando dos aislamientos distintos.

Tabla 3. Valores de IC_{50} e IC_{90} de los Nbs seleccionados.

Nbs	IC_{50} (nM)	IC_{90} (nM)	
	pVNT	PRNT	TCDI ₅₀ /IF
Nb-39	6,48	3,02	400
Nb-43	12,08	26,9	100

Nb-45	17,79	ND	338
Nb-51	54,7	ND	ND
Nb-53	72,68	ND	ND
Nb-104	3,36	13,4	300
Nb-110	6,05	221	1000
Nb-145	24,23	231	neg

La potencia neutralizante de cada Nb se evaluó mediante tres metodologías diferentes: pVNT, PRNT e IF. Las concentraciones inhibitorias medias y 90 (IC_{50} y IC_{90}) se calcularon para cada Nb en cada ensayo, como se describe en la sección de métodos. ND: no determinado.

3.5.4. Estudio de la afinidad relativa y especificidad de los Nbs

Se estudió la capacidad de unión al antígeno (SARS-CoV-2 S-2P y RBD) de los Nbs neutralizantes mediante la técnica de ELISA, con el fin de determinar afinidades relativas y especificidades de dominio (**Figura 20, columnas 14 y 15**). La mayoría de ellos mostraron valores de concentración efectiva media (EC_{50}) en el rango nanomolar de un solo dígito, lo que indica una fuerte unión a estas proteínas (**Figura 23 y Tabla 4**).

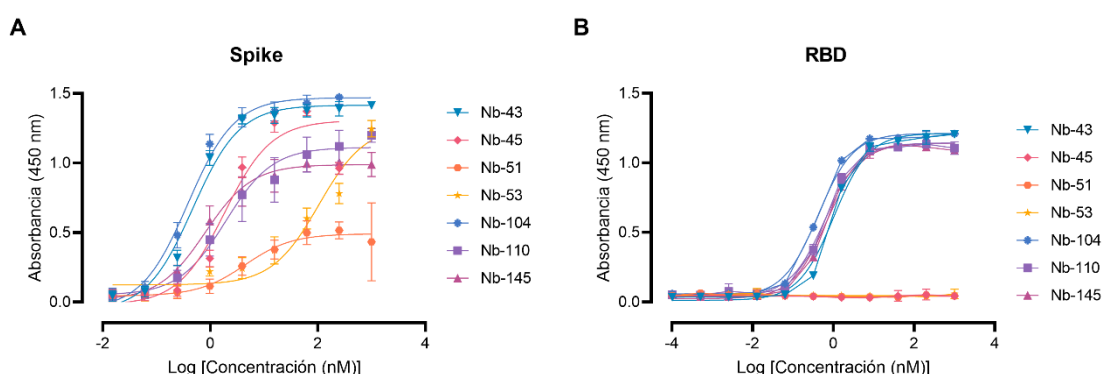


Figura 23. Afinidad de los Nbs por RBD y S-2P de SARS-CoV-2 mediante ELISA. La unión de los Nbs seleccionados se analizó en placas recubiertas con las proteínas S-2P (A) y RBD (B) del SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1. Se asignaron diferentes colores a cada curva según la identidad del Nb. Las barras de error representan la desviación estándar (DE) de triplicados.

Tabla 4. Valores de EC_{50} de los Nbs seleccionados contra las proteínas S-2P y RBD.

Nb	EC_{50} (nM)	
	S-2P	RBD
Nb-43	0,47	1,02
Nb-45	1,84	neg
Nb-51	4,42	neg
Nb-53	103,6	neg
Nb-104	0,38	0,42
Nb-110	1,93	0,62
Nb-145	0,81	0,69

3.5.5. Estudios de competencia de los Nbs seleccionados

A continuación, se evaluó la capacidad de los Nbs seleccionados de bloquear la interacción de RBD con el receptor ACE2 en un ensayo de competencia puesto a punto

en el laboratorio (**Figura 24A**). Se observó que los Nbs 39, Nb-43, Nb-104, Nb-110 y Nb-145 competían con ACE2 por la unión a RBD con un IC₅₀ de 9,16, 80,21, 5,47, 15,94 y 14,83 nM, respectivamente. Estos fueron clasificados como Nbs afines a RBD. Por otro lado, los Nbs 45, Nb-51 y Nb-53 no competían con ACE2, lo que sugiere que se unen a epítopes fuera del RBD, y fueron clasificados como no afines a RBD.

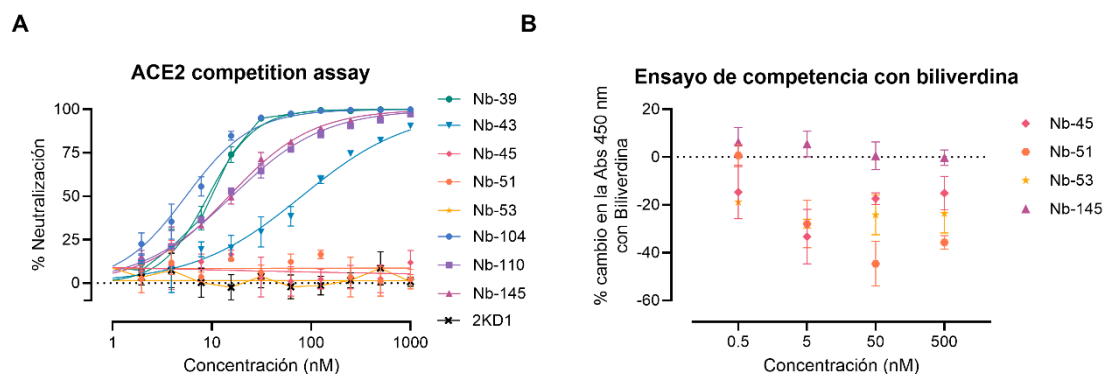


Figura 24. Ensayos de competencia ACE2-RBD y biliverdina. (A) ELISA competitivo de la unión de ACE2 al RBD inmovilizado en placas mediante concentraciones crecientes de Nbs. La unión específica de ACE2-HRP al RBD se detectó con un reactivo cromogénico. El IC₅₀ se calculó ajustando la inhibición de los Nbs diluidos en serie a una curva sigmoide de respuesta a la dosis. El experimento se realizó por triplicado; (B) ELISA competitivo de Nbs a diferentes concentraciones uniéndose a la proteína S-2P en presencia de 5 µM de biliverdina.

Para estudiar con mayor precisión el epítipo reconocido por los Nbs no afines a RBD, se realizó un ensayo de competencia con biliverdina, ya que se ha descrito que este metabolito se une a un epítipo en el NTD de la proteína S y compite con una fracción de anticuerpos séricos específicos para dicha proteína [286]. Los resultados demostraron que la adición de 5 µM de biliverdina redujo la unión del Nb-45, Nb-51 y Nb-53 a la proteína S-2P, con cambios porcentuales en la absorbancia de -25,19, -20,96 y -29,24, respectivamente. En cambio, la unión de Nb-145 (afín a RBD) no se vio afectada por la adición de biliverdina (4,45%) (**Figura 24B**). En un experimento separado, se realizó un ensayo de respuesta a dosis utilizando una concentración fija de Nbs (100 nM) y concentraciones variables de biliverdina (12.5 a 0,1 µM). En este estudio, se logró confirmar que la unión de Nb-45 y Nb-51 a la proteína S, se redujo en presencia de biliverdina y que esta disminución aumentó con una mayor concentración de este metabolito (**Figura 25**). Para el caso del Nb-53 no se observó una disminución significativa en la capacidad de unión a la proteína S. En conjunto, estos resultados sugieren que los Nbs neutralizantes no afines a RBD podrían estar detectando epítipes ubicados cerca del NTD de la proteína S-2P.

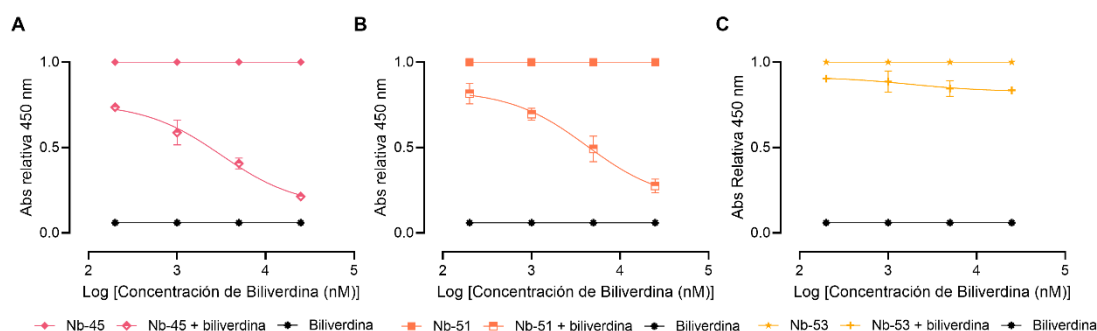


Figura 25. La biliverdina disminuye la unión de los Nbs no afines a RBD a la proteína S-2P. Curvas de dosis-respuesta relativas para el Nb-45 (A), Nb-51 (B) y Nb-53 (C) en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de biliverdina.

3.5.6. Estudio de la capacidad neutralizante de los Nbs seleccionados frente a las variantes de SARS-CoV-2

A continuación, se evaluó la capacidad neutralizante de los Nbs afines o no afines a RBD contra las variantes de SARS-CoV-2. Para ello, se generaron pseudovirus que expresaban la proteína S de las variantes Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Delta (B.1.617.2) y Ómicron (B.1.1.529, BA.2, XBB y XBB.1.5). Excepto por el Nb-43, los Nbs afines a RBD mantuvieron su capacidad neutralizante sobre la variante Alfa (**Tabla 5**). Los Nbs 104 y Nb-145 demostraron potencias comparables con la cepa WT, mientras que el Nb 110 mostró una reducción de aproximadamente 20 veces en su potencia neutralizante. Se observaron resultados similares para la variante Delta, aunque las potencias neutralizantes disminuyeron para todos los Nbs afines a RBD (~25 veces). Por otra parte, se observó una reducción severa o pérdida completa de las actividades neutralizantes de estos Nbs cuando se realizó este ensayo contra la variante Beta. El Nb-43 sólo fue capaz de neutralizar las variantes Ómicron B.1.1.529 y BA.2.

Al analizar los Nbs no afines a RBD, las potencias neutralizantes del Nb-53 disminuyeron entre 4 y 10 veces contra las variantes Alfa, Beta y Ómicron XBB, en comparación con la potencia obtenida frente a la cepa WT. Este mismo Nb perdió completamente su actividad neutralizante contra las subvariantes Ómicron BA.1 y BA.2 (**Tabla 5**). Los Nbs 45 y Nb-53 exhibieron la actividad neutralizante más amplia contra todas las variantes probadas. Notablemente, el Nb-45 mostró valores de IC_{50} más bajos en comparación con Nb-53, y ambos Nbs mantuvieron casi las mismas potencias neutralizantes contra las subvariantes Ómicron XBB en comparación con la cepa WT.

Tabla 5. Títulos de neutralización de los Nbs afines o no afines a RBD frente a las variantes de SARS-CoV-2.

Nbs	pVNT IC ₅₀ (nM)						
	Alfa	Beta	Delta	Ómicron B.1.1.529	Ómicron BA.2	Ómicron XBB	Ómicron XBB.1.5
Afines a RBD	Nb-43	-	-	394,7	204,8	-	-
	Nb-104	18,29	121,8	-	-	-	-
	Nb-110	133,9	121,8	-	-	-	-
	Nb-145	86,65	384,4	-	-	-	-
No afines a RBD	Nb-45	83,66	248,0	214,6	112,0	30,73	42,17
	Nb-51	215,3	-	-	-	285,6	316,9
	Nb-53	91,2	701,8	322,6	135,3	145,2	136,7

3.5.7. Análisis del rol de la mutación L452R de la variante Delta en la capacidad neutralizante de los Nbs

Las mutaciones en RBD han demostrado aumentar la replicación, transmisibilidad y capacidad de unión a las células hospedadoras del SARS-CoV-2. En particular, la variante Delta presenta la mutación L452R, la cual está asociada a la capacidad para evadir ciertas respuestas inmunitarias y es importante para la unión de anticuerpos [287]. Por este motivo, se construyó una mutante de la variante Delta mediante mutagénesis dirigida, en donde se revertió la mutación al aminoácido en la cepa WT (Figura 26).

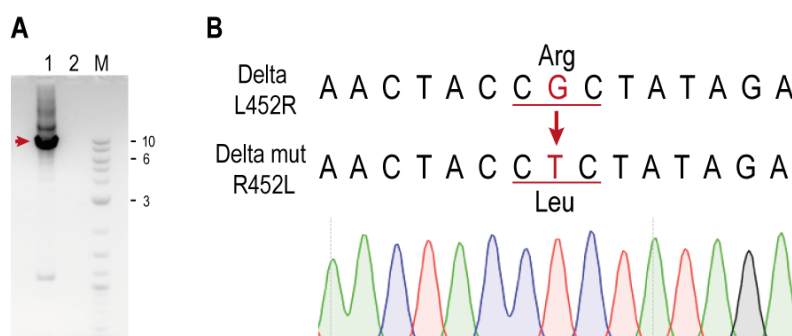


Figura 26. Mutagénesis dirigida de la variante Delta. (A) Gel de electroforesis de agarosa con el producto de PCR esperado (aproximadamente 9000 pb) correspondiente a la secuencia nucleotídica de la proteína S. 1: amplicón. 2: control negativo de la reacción. M: marcador de ADN en kpb. (B) Análisis de secuencia de los clones obtenidos luego del clonado del producto de PCR.

Una vez confirmada la reversión de la mutación mediante secuenciación, se generaron los pseudovirus y se evaluó la capacidad neutralizante de todos los Nbs en estudio con el fin de estudiar si se recupera la potencia de neutralización (Nbs 43 y 51) o mejora la

misma. Sorprendentemente, el Nb-43 fue capaz de neutralizar la variante Delta mutada con la misma potencia neutralizante que la cepa WT (valores de IC_{50} de 14,14 nM y 12,08, respectivamente) (**Figura 27**). Estos resultados indican que el aminoácido L452 es importante para la unión del Nb-43 a RBD.

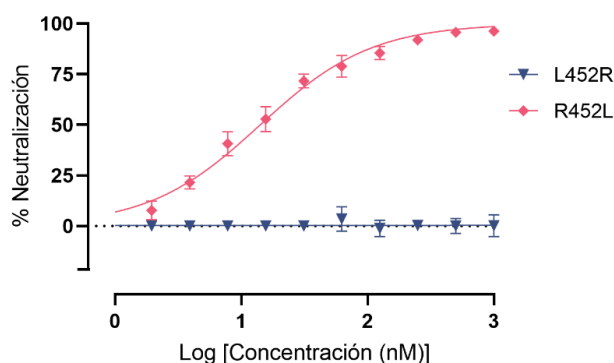


Figura 27. Actividad neutralizante del Nb-43 a la variante Delta original y mutante. El aminoácido en la posición 452 se cambió de Arginina a Leucina mediante mutagénesis dirigida. Las curvas de neutralización y el IC_{50} se midieron mediante pVNT por triplicado.

3.5.8. Estudio de la potencia neutralizante de cócteles de Nbs

Finalmente, se seleccionaron los Nbs que podían neutralizar las variantes Ómicron, ya que estas variantes estaban circulando recientemente en la población. Se probó un cóctel de Nb-43 (afín a RBD), Nb-45 y Nb-53 (no afines a RBD). Las combinaciones de Nb-43 y Nb-45 o Nb-45 y Nb-53 no mostraron ningún aumento en la capacidad neutralizante contra la variante Ómicron B.1.1.529, pero una mezcla de Nb-43 y Nb-53 aumentó significativamente su potencia (ANOVA de una vía, Tukey HSD, $p < 0.001$) (**Figura 28, Tabla 6**). Cuando se mezclaron los Nb-45, Nb-51 y Nb-53, se observó un aumento significativo en su capacidad neutralizante en comparación con Nb-43 solo o la combinación de Nb-43 y Nb-45 ($p < 0.001$).

Para la variante Ómicron BA.2, las combinaciones de Nb-43 y Nb-45 o Nb-43 y Nb-53 redujeron significativamente su valor de IC_{50} ($p < 0.001$), sugiriendo un efecto sinérgico entre dos Nbs que presumiblemente se unen a diferentes epítopes (**Figura 28, Tabla 6**). La potencia de neutralización aumentó significativamente cuando se combinaron los Nb-45, Nb-51 y Nb-53 en comparación con cada Nb por separado ($p < 0.001$). A diferencia de los resultados obtenidos para la variante Ómicron B.1.1.529, la mezcla de tres Nbs, en comparación con la combinación de dos Nbs, mostró una diferencia significativa en su

valor de IC_{50} para la variante Ómicron BA.2, especialmente para las mezclas de Nb-43 y Nb-53 o Nb-45 y Nb-53, $p < 0.001$.

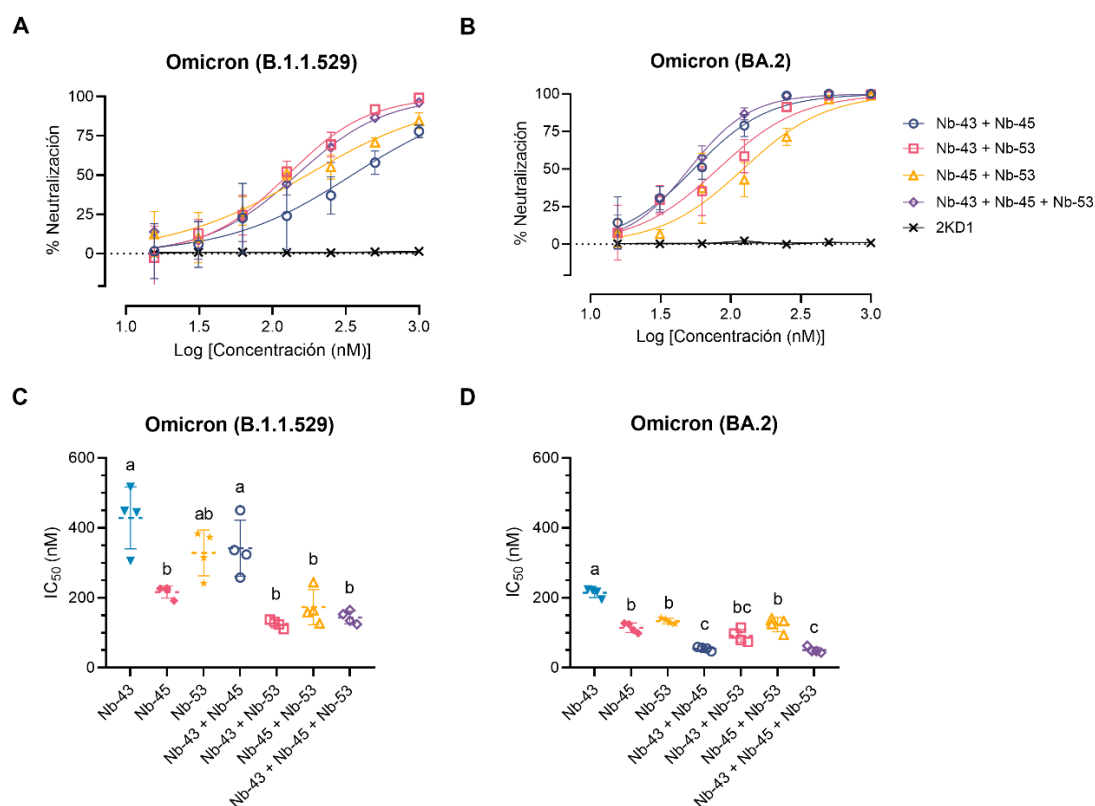


Figura 28. Mejora de las potencias de neutralización contra las variantes Ómicron utilizando cócteles de Nbs. (A) Porcentaje de neutralización ejercido por una mezcla de dos o tres Nbs contra la variante Ómicron B.1.1.529; (B) Experimentos similares al (A) realizados con la variante Ómicron BA.2. Comparación de valores de IC_{50} de combinaciones de Nbs frente a Nbs individuales para la variante Ómicron B.1.1.529 (C) y la variante Ómicron BA.2 (D). Los Nbs individuales o las mezclas de Nbs con diferentes letras difieren significativamente en IC_{50} (ANOVA de un factor, comparación múltiple de Tukey, $p < 0.001$), mientras que las letras compartidas indican que no hay diferencia significativa.

Tabla 6. Potencia de neutralización expresada en valores de IC_{50} para los Nbs solos o en combinación.

Nbs	IC_{50} (nM)	
	B.1.1.529	BA.2
Nb-43	394,7	204,8
Nb-45	214,6	112,0
Nb-53	322,6	135,3
Nb-43 + Nb-45	348,4	54,39
Nb-43 + Nb-53	126,8	81,4
Nb-45 + Nb-53	171,8	122,3
Nb-43 + Nb-45 + Nb-53	146,5	50,5

Se realizaron experimentos similares con las variantes Ómicron XBB y XBB.1.5 y los Nbs no afines a RBD, ya que solo esos Nbs podían neutralizar estas cepas. No se observó un aumento significativo en la capacidad neutralizante en este caso (**Figura 29, Tabla 7**).

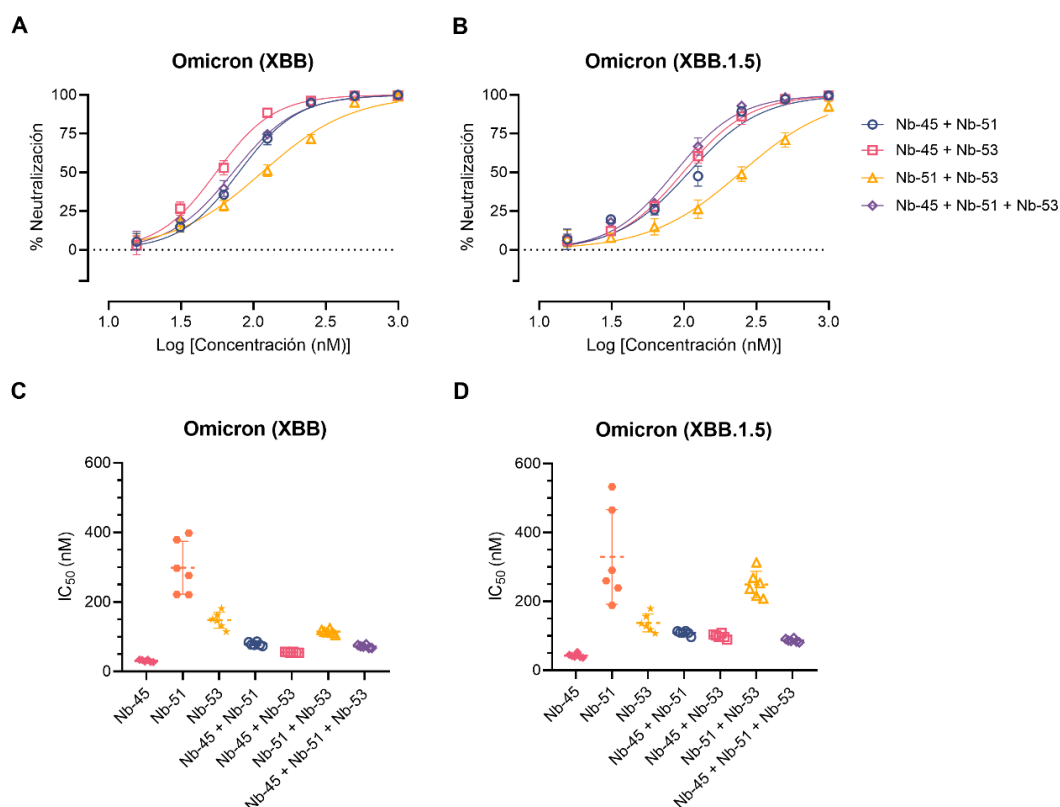


Figura 29. Mejora de las potencias de neutralización contra las variantes Ómicron utilizando cócteles de Nbs. (A) Porcentaje de neutralización ejercido por una mezcla de dos o tres Nbs contra la variante Omicron XBB; (B) Experimentos similares al (A) realizados con la variante Ómicron XBB.1.5. Comparación de valores de IC_{50} de combinaciones de Nbs frente a Nbs individuales para la variante Ómicron XBB (C) y la variante Omicron XBB.1.5 (D).

Tabla 7. Potencia de neutralización expresada en valores de IC_{50} para los Nbs solos o en combinación.

Nbs	IC_{50} (nM)	
	XBB	XBB.1.5
Nb-45	30,73	42,17
Nb-51	285,6	316,9
Nb-53	145,2	136,7
Nb-45 + Nb-51	79,27	108,2
Nb-45 + Nb-53	55,3	98,58
Nb-51 + Nb-53	114,6	247,4
Nb-45 + Nb-51 + Nb-53	72,35	86,44

3.6. Mapeo de epítopes y predicción in silico del modo de unión

En primer lugar, se analizó la capacidad de los Nbs seleccionados de reconocer epítopes lineales utilizando un *array* de péptidos que cubría toda la secuencia de aminoácidos de

la glicoproteína S (BEI Resources, NR-52402). Los péptidos eran de 17 o 13 AA de longitud, con una superposición de 10 AA. La mayoría de los Nbs no reaccionaron con los péptidos, excepto los Nb-39 y Nb-33. El Nb-39 reconoció un péptido entre los aminoácidos 407 a 423, correspondiente al motivo de unión al receptor (RBM) dentro del RBD. El Nb-33 se unió a un péptido entre las regiones HR1 y HR2, ambas dentro del dominio S2, lo que coincide con el resultado de que este Nb fue seleccionado con la proteína S y no reaccionó con RBD en ELISA (**Tabla 8, Figura 30**).

Tabla 8. Identificación de epítopes en la proteína S mediante un *array* de péptidos.

Nb	Péptido	Secuencia aminoacídica	OD _{405nm}	Ubicación
Nb-33	161	1121-FVSGNCDVVIGIVNNTV-1137	0,719	S2
Nb-39	59	407-VRQIAPGQTGKIADYNY-423	0,423	RBM

Por otra parte, considerando que los Nb-45 y Nb-53 mostraron la actividad neutralizante más amplia contra todas las variantes probadas, se seleccionaron y modelaron para un análisis adicional de predicción de estructura. También se incluyó un Nb afín a RBD, Nb-43, para su estudio.

HADDOCK proporcionó múltiples resultados con puntuaciones variadas, y se seleccionó la mejor pose que posicionó los CDR de los Nbs en contacto directo con la proteína S (**Tabla 9**). El análisis de los residuos interactuantes entre el Nb-43 y la proteína S sugirió que el sitio de unión estaría ubicado en la interfaz de unión del complejo. Los residuos 469, 511 y 512 del RBD pueden contribuir como residuos críticos para la afinidad de unión (**Figura 30A**). Otros residuos, del 463 al 511, a una distancia menor de 5 Å, también podrían estar interactuando con los residuos del Nb. Teniendo en cuenta que el residuo L452 es crucial para la interacción con el Nb-43 y al analizar su posición estructural en relación con los residuos predichos por HADDOCK, se observó que todos ellos se encuentran a una distancia menor a 5 Å (**Figura 31**). Esto sugiere una coherencia entre los resultados experimentales y las predicciones de HADDOCK, confirmando la precisión del programa en identificar residuos claves de la proteína S que interactúan con el Nb. Por otra parte, en colaboración con investigadores del Instituto Karolinska (Suecia), se intentó determinar el epítipo exacto del Nb-43 y se envió una muestra de este Nb para analizar su interacción con la proteína S mediante microscopía electrónica criogénica. Sin embargo, estudios preliminares del complejo Nb-43 y S provocaron el desensamblaje de la estructura de la proteína, impidiendo la determinación exacta del sitio de unión (resultados no mostrados).

Para los Nbs no afines a RBD (Nb-45 y Nb-53), el análisis de las interacciones predichas permitió identificar posibles residuos interactuantes en el NTD de la proteína S. Los residuos 54 (CDR2), 101 y 114 (CDR3) de Nb-45 podrían estar interactuando con residuos en las posiciones 60, 244 y 249, respectivamente (**Figura 30B**). En el caso de Nb-53, los posibles residuos involucrados en la interacción Nb-NTD podrían ser 54 (CDR2), 106 y 107 (CDR3) y 116, 206 y 231, respectivamente (**Figura 30C**). Otros residuos del NTD localizados a menos de 5 Å serían 62, 191 y del 245 al 249 para Nb-45 y 115, 117, 205, del 227 al 230 y 236 para Nb-53.

A su vez se realizó un análisis HADDOCK de la biliverdina y se observó que el sitio de unión predicho del Nb-45 y de esta molécula se superpone. Cuando se realizó un análisis similar para el Nb-53, observamos una superposición parcial con el sitio de reconocimiento de la biliverdina. Estos hallazgos apoyan los resultados del ensayo de competencia (**Figura 24**), pero un análisis adicional de mutagénesis de la proteína S podría confirmar los residuos críticos predichos que contribuyen a las interacciones de unión entre los Nbs y la proteína S.

Tabla 9. Resumen de los resultados HADDOCK para los complejos Nb-proteína seleccionados.

Ligando	HADDOCK scores	Energía VdW	Energía electrostática	Energía de desolvatación	Área de superficie enterrada
Biliverdina	-40,4	-29,2	-86,9	-2,5	716,8
Nb-43	-48,1	-47,2	-176,4	3,5	1474,7
Nb-45	-63,7	-92,6	-259,2	-19,3	2374,6
Nb-53	-48,7	-93,3	-177,7	-19,9	2388,6

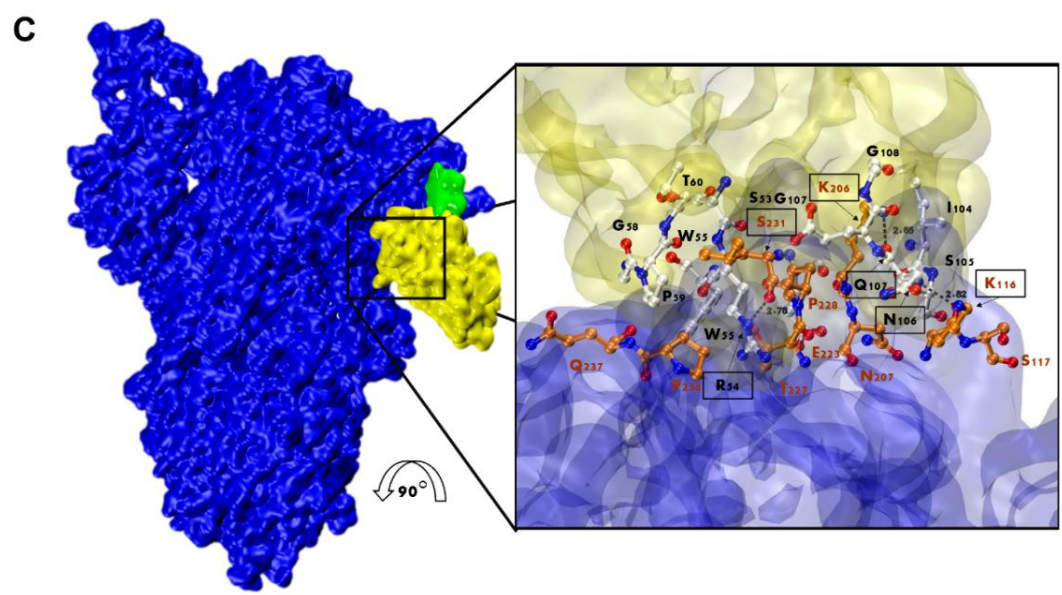
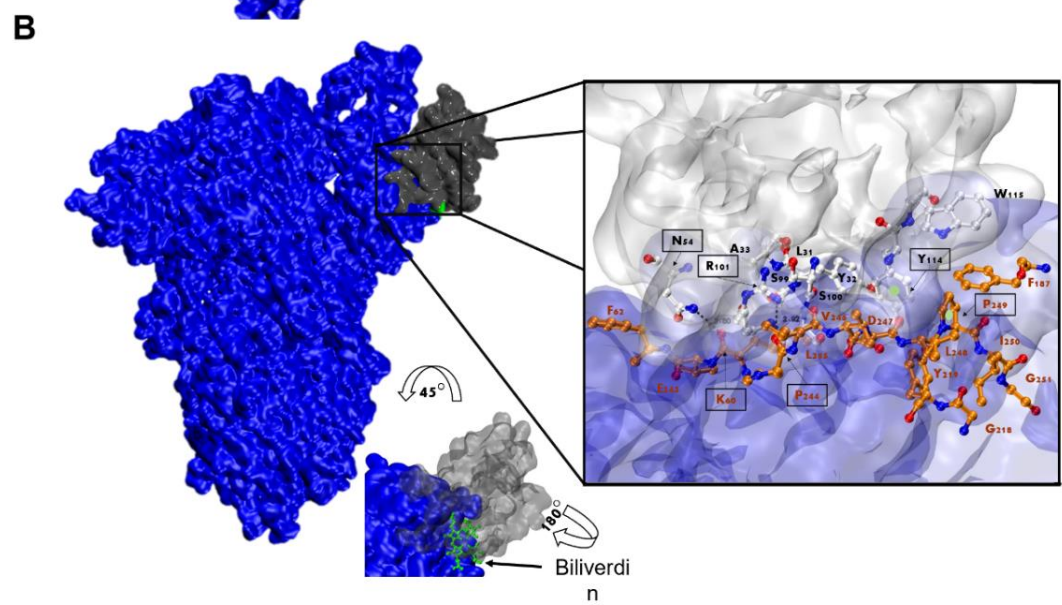
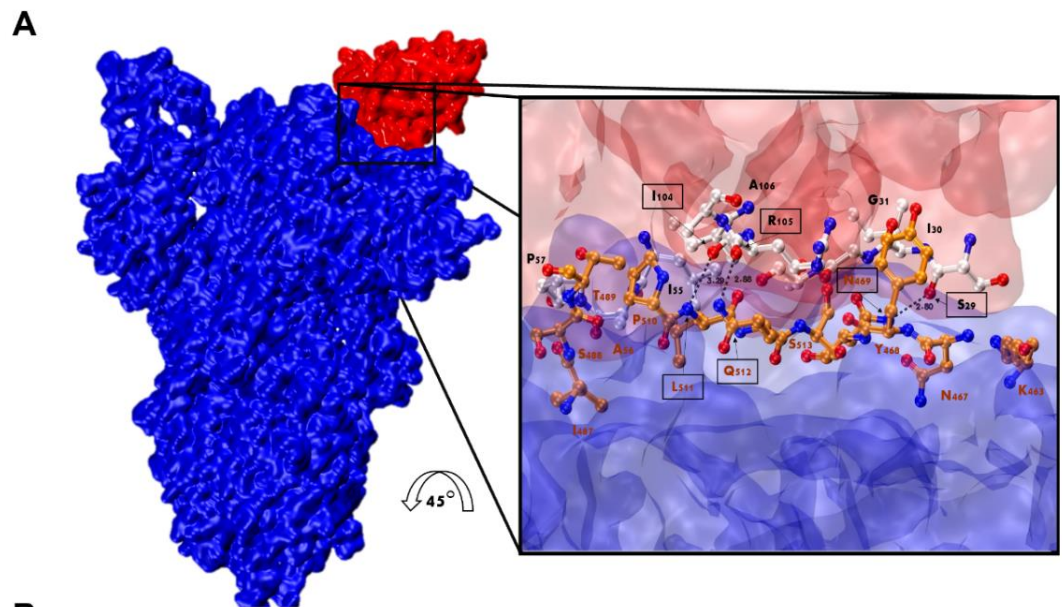


Figura 30. Análisis de las interacciones Nb-proteína. Predicción de la interacción del Nb-43 (A, rojo), Nb-45 (B, gris) y Nb-53 (C, amarillo) con la proteína S (azul). La biliverdina se indica en verde. Los tres paneles muestran una vista general de la interacción S-Nb y una vista detallada de la zona involucrada en la misma. La vista detallada muestra el sitio de unión predicho, con los AA en rojo representando aquellos de la proteína S y en negro los que pertenecen al Nb. Los AA encerrados en un cuadro negro e indicados con una flecha muestran residuos que podrían formar enlaces de hidrógeno (líneas punteadas). La sección B muestra círculos verdes que representan posibles interacciones de apilamiento Pi.

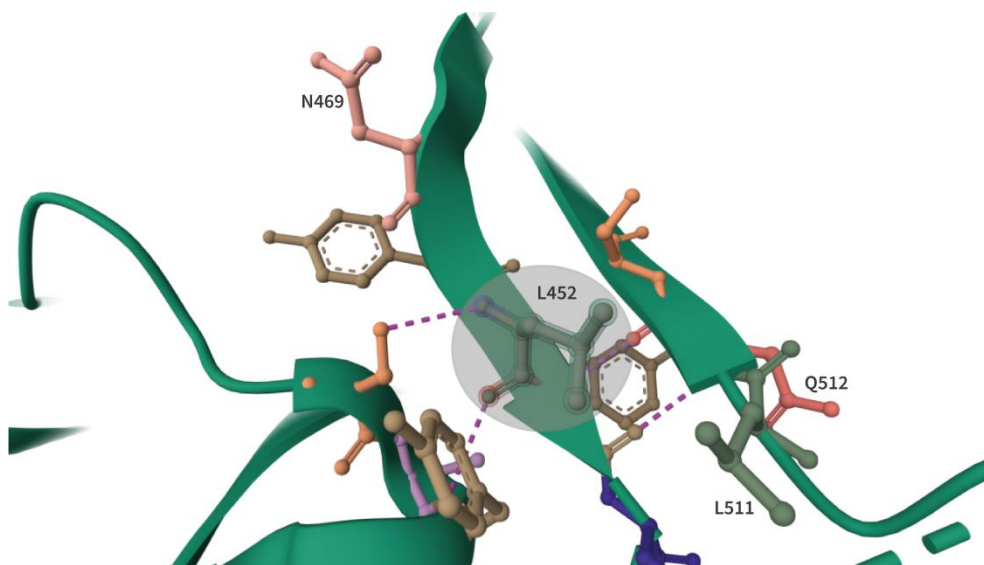


Figura 31. Proximidad estructural entre los residuos N469, L511 y Q512 de la proteína S predichos por el programa HADDOCK como aquellos interactuantes con el Nb-43 y el residuo L452 (sombreado).

4. Discusión

La evolución persistente del SARS-CoV-2 continúa generando nuevas variantes de interés, las cuales conllevan la posibilidad de una mayor transmisibilidad, virulencia y escape inmunológico. Aunque la OMS declaró el fin de la emergencia sanitaria internacional, el SARS-CoV-2 continúa circulando globalmente, con miles de nuevas infecciones reportadas semanalmente. Este contexto subraya la posibilidad de brotes estacionales recurrentes, similar a otros virus respiratorios. La propagación de variantes resistentes y la ausencia de anticuerpos terapéuticos efectivos plantean una amenaza particular para las personas en los grupos de riesgo o con diferentes tipos de inmunodeficiencias. Por estos motivos, el desarrollo de terapias efectivas o moléculas de amplio espectro para combatir la enfermedad sigue siendo una prioridad en el ámbito de la salud pública.

En respuesta a esta necesidad, se han desarrollado múltiples Nbs con aplicaciones diagnósticas y terapéuticas prometedoras [73], [104], [136], [284], [288], [289]. Los Nbs monoméricos y sus formatos diseñados han demostrado una fuerte actividad neutralizante contra las diferentes VOCs que han surgido, incluidas las subvariantes Ómicron [98], [279], [284], [290], [291], [292]. La intensa producción de nuevos Nbs recombinantes resalta la relevancia de esta plataforma tecnológica, que se espera que llegue al uso clínico para el tratamiento de enfermedades virales en un futuro cercano [293].

En este capítulo, se reportó el desarrollo y la caracterización de un conjunto novedoso y diverso de Nbs con potentes capacidades neutralizantes. Se identificaron 7 moléculas promisorias, clasificadas en función de su afinidad o no a RBD. En particular, el Nb-45 (no afín a RBD) demostró una actividad neutralizante amplia contra todas las variantes de SARS-CoV-2 estudiadas. Además, la combinación de esta molécula con el Nb-43 mejoró significativamente su actividad neutralizante. Estos hallazgos destacan su potencial como molécula terapéutica de amplio espectro. A su vez, gracias a un trabajo colaborativo con investigadores de *Virginia Tech Institute*, se evaluó la eficacia de estos Nbs en un modelo animal, demostrando que el Nb-45 y otros Nbs lograron una reducción significativa de la carga viral [98]. Los resultados presentados en este capítulo y este estudio conjunto han servido de base para la publicación de nuestros resultados en un artículo científico, subrayando la relevancia de estos hallazgos en el desarrollo de terapias basadas en Nbs.

Inicialmente, se intentó aislar Nbs dirigidos a S-2P y RBD a partir de una biblioteca de Nbs preexistente, producida contra la cepa Mebus de BCoV, ya que la proteína S de ambas cepas muestra una cierta similitud en la secuencia (44,4%) y una estructura global similar. Se logró identificar un Nb (Nb-10M) que se une a RBD de SARS-CoV-2. Sin embargo, este Nb no mostró actividad neutralizante contra ninguna de las variantes de SARS-CoV-2 estudiadas. Por este motivo se inmunizó a una llama con proteínas recombinantes S-2P y RBD para desarrollar Nbs específicos y con capacidad neutralizante.

Luego de la inmunización de una llama, la generación de una biblioteca inmune excepcionalmente grande ($1,8 \times 10^9$ transformantes individuales) y la selección de Nbs específicos, se obtuvieron diferentes grupos de Nbs que exhibieron una alta variabilidad

de secuencia y se originaron a partir de un conjunto diverso de genes V, D y J. Nuestros resultados son consistentes con otros estudios que han explorado bibliotecas derivadas de camélidos, donde se encontró una impresionante diversidad en la secuencia de nucleótidos de los Nbs, la especificidad de los mismos y la capacidad neutralizante, especialmente después de inmunizaciones sucesivas para promover el desarrollo de la superinmunidad [276], [294]. Esta diversidad es crucial para identificar Nbs que puedan reconocer y neutralizar nuevas variantes de interés, incluyendo las subvariantes de Ómicron que presentan múltiples mutaciones.

El análisis detallado mediante técnica de redes mostró que los Nbs están organizados en varios *clústeres* que comparten diferentes propiedades, como especificidad de unión, potencia de neutralización, longitud de CDR3 y pI (**Figura 32**). Es importante destacar que se aislaron Nbs con identidades de secuencia similares utilizando dos antígenos diferentes para el biopaneó. Dentro de los Nbs seleccionados, la mayoría (32 de 43) reconocen la proteína RBD. Según se ha reportado en otros estudios, la menor cantidad de moléculas no afines a RBD recuperados de una biblioteca de Nbs probablemente se deba a la alta naturaleza antigénica de este dominio. Además, el efecto de enmascaramiento provocado por la capa de glicanos en las regiones fuera de RBD también contribuye en estos resultados [295], [296].

A pesar de que los Nbs afines a RBD mostraron altas capacidades neutralizantes contra la cepa WT (IC_{50} promedio: 10,44 nM), tuvieron un alcance limitado contra las variantes del virus evaluadas. En este estudio, se observó una reducción severa o pérdida completa de capacidad neutralizante de estos Nbs frente a las variantes Beta y Ómicron. Esto se atribuye probablemente a las mutaciones K417N, E484K y N501Y en la RBD de la variante Beta y las 22 sustituciones de residuos presentes en las subvariantes XBB [297].

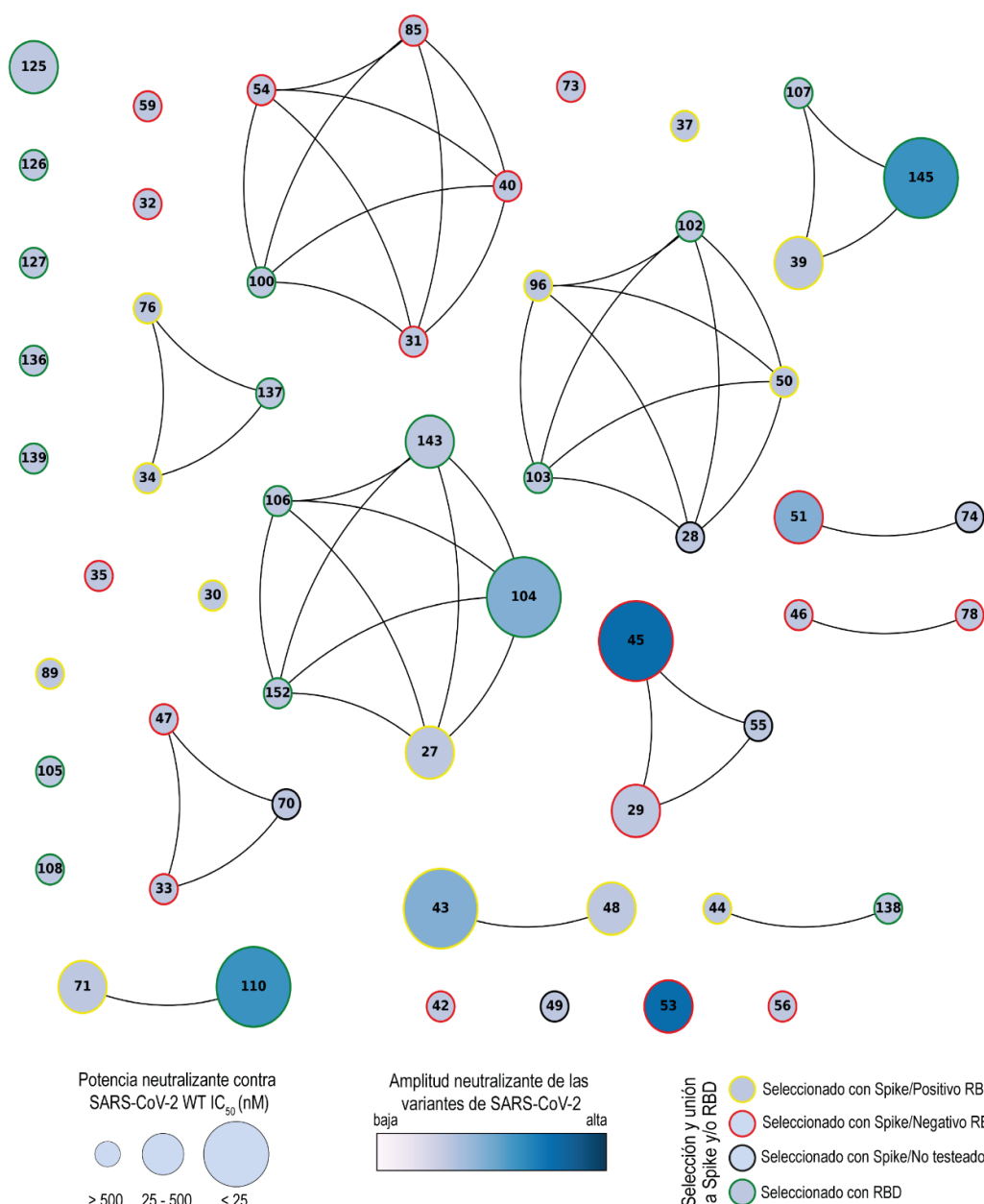


Figura 32. Análisis de redes de Nbs únicos. Una representación visual que resume la unión y neutralización de RBD y S-2P para los 43 Nbs aislados. Los Nbs se muestran como nodos o círculos de diferentes tamaños y colores, y aquellos con una identidad de secuencia CDR3 mayor al 70% están conectados. La potencia de neutralización contra el SARS-CoV-2 WT se representa por el tamaño de los nodos y el color del relleno del nodo representa la amplitud de la neutralización de variantes del virus. Los bordes de los nodos están coloreados en el exterior basados en el antígeno utilizado para el *biopanning* y en la capacidad de unión o no unión a RBD.

Tres de los *clústeres* más grandes obtenidos por análisis de redes están compuestos por Nbs con fuerte actividad neutralizante (IC_{50} por debajo de 25 nM) y dos de ellos poseen, a su vez, un Nb con amplio espectro de neutralización de variantes de SARS-CoV-2 (Figura 32). Un ejemplo es el caso del Nb-45, no afín a RBD, que podría estar interactuando con el dominio NTD de la proteína S, como se observó en los ensayos de

competencia. También se han reportado anticuerpos neutralizantes dirigidos a este dominio por otros grupos de investigación [286], [298]. Aunque se necesitarían experimentos cristalográficos y estructurales para comprender en detalle la interacción Nb-NTD, la predicción de unión de epítopes sugirió que Nb-45 y Nb-53 estarían interactuando con este dominio.

Una característica de los Nbs es su capacidad de reconocer epítopes conformacionales, aunque se han reportado algunas excepciones a esto y ciertos Nbs se unen a epítopes lineales. En este contexto, el Nb-39 (afín a RBD, con fuerte capacidad de unión a las proteínas S-2P y RBD y alta potencia neutralizante frente al virus WT) reconoció un péptido lineal correspondiente al RBM dentro del RBD en un arreglo de péptidos S. Este resultado se correlaciona con la capacidad de este Nb para bloquear la interacción entre el RBD y el ACE2, además de su fuerte actividad neutralizante *in vitro* y protección *in vivo* en ratones [98]. Por otro lado, el Nb-33 (no afín a RBD, con fuerte capacidad de unión a S) reconoció un péptido entre las regiones HR1 y HR2, dentro de la subunidad S2. Estas regiones son altamente conservadas e inmunogénicas, desempeñando un papel importante en el proceso de fusión antes de la internalización por endocitosis [299], [300]. Además, se ha observado que los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos a estas regiones suelen ser neutralizantes [299]. Si bien el Nb-33 no mostró una fuerte actividad neutralizante, el mismo resultó particularmente útil para el desarrollo de un biosensor destinado a la detección de variantes del virus en aguas residuales, alimentos y muestras clínicas [94]. En general, estos resultados sugieren que nuestros Nbs reconocen no solo epítopes conformacionales en la superficie de la proteína S, sino que también interactúan con regiones lineales de la misma.

Por otro lado, nuestro análisis de acoplamiento molecular proporcionó resultados valiosos sobre los posibles sitios de unión de los Nbs a su blanco. En cuanto al Nb-43, los resultados sugieren que los aminoácidos 469, 511 y 512 son importantes para la unión esta molécula a RBD. Además, un experimento de mutagénesis dirigida en la variante Delta reveló que el residuo en la posición 452, estructuralmente cercano a los residuos mencionados, también desempeña un papel importante en la unión. Cuando este residuo se cambia de Arginina, un aminoácido cargado, a Leucina, un aminoácido no polar, la unión de Nb-43 al RBD se recupera. Estudios previos han indicado que la mutación L452R en la variante Delta genera una zona cargada cerca de la superficie, modificando así la afinidad del virus hacia diferentes anticuerpos [301]. En colaboración

con investigadores del Instituto Karolinska se realizaron múltiples intentos para resolver la estructura cristalográfica de la proteína S en complejo con el Nb-43. Lamentablemente, la unión del Nb-43 desestabilizó la estructura de la proteína S, lo que impidió resolver la estructura del complejo. Esto probablemente refleje un mecanismo de neutralización, como se ha reportado previamente [302].

La aparición y propagación de variantes del SARS-CoV-2 capaces de evadir la neutralización por mAbs representa un desafío para el desarrollo de vacunas y terapias efectivas [262]. Por esta razón, se han propuesto cócteles de Nbs, compuestos por dos o más Nbs que reconocen diferentes epítopes de la proteína S, como una estrategia para aumentar la potencia neutralizante y prevenir el escape viral [296], [302]. Este trabajo demostró que la combinación de un Nb que se une a RBD (Nb-43) y otro que no se une a este dominio (Nb-45, específico para el NTD) mejora la potencia neutralizante contra algunas variantes de Ómicron (B.1.1.529 y BA.2). Zhao y colaboradores han reportado el desarrollo de un Nb capaz de unirse tanto al RBD como al NTD del trímero S, a través del mismo bucle CDR3, mostrando una actividad neutralizante amplia [303]. Estos hallazgos resaltan el potencial de los cócteles de Nbs como una estrategia para desarrollar nuevas herramientas profilácticas y terapéuticas contra el SARS-CoV-2, especialmente en el contexto de variantes virales emergentes. Sin embargo, es importante mencionar que el Nb-45 por sí solo tiene una amplia capacidad neutralizante y puede inhibir todas las variantes probadas en este trabajo.

Los Nbs desarrollados en este trabajo reconocen diferentes epítopes, lo que no solo respalda su uso en cócteles o como moléculas multivalentes diseñadas para detectar y controlar la enfermedad del SARS-CoV-2, sino que también subraya su potencial terapéutico. Más importante aún, los Nbs seleccionados poseen una fuerte potencia de neutralización *in vitro* e *in vivo* en su forma monomérica. Aunque muchos Nbs anti-SARS-CoV-2 desarrollados previamente han sido multimerizados para mejorar la potencia neutralizante a través de un efecto de aumento de la avidéz, los resultados obtenidos sugieren que incluso en su forma monomérica, nuestros Nbs son eficaces. Estudios anteriores han mostrado que la trimerización de Nbs puede resultar en una ganancia significativa en el valor de KD, un aumento en la afinidad y una capacidad neutralizante más potente en comparación con la dimerización [304], [305]. En base a estos hallazgos, sería interesante explorar si los Nbs multivalentes podrían ofrecer una capacidad inhibitoria aun mayor y más amplia. Esto es factible, ya que se ha informado

que la superficie del RBD es lo suficientemente grande como para acomodar varios Nbs al mismo tiempo [306].

Por lo tanto, considerando su capacidad para unirse a diferentes epítopes y su actividad neutralizante, estos Nbs representan herramientas prometedoras para el desarrollo de formulaciones terapéuticas destinadas a neutralizar variantes emergentes, prevenir el escape viral y tratar la enfermedad. Esta versatilidad y eficacia destacan el valor de los Nbs como agentes innovadores que podrían revolucionar el tratamiento y la prevención de enfermedades virales en el contexto de Una Salud (*One Health*).

Capítulo 4: Modificación de Nbs para la detección de la proteína NS1 de dengue

1. Introducción

1.1. Estructura del virus del dengue

El virus del dengue pertenece al género *Flavivirus* y a la familia *Flaviviridae* y existe como un serocomplejo de 4 serotipos genéticamente relacionados, pero antigénicamente distintos, DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 [307]. Los viriones de DENV, como así también de otros flavivirus, son partículas esféricas compuestas por tres proteínas estructurales (**Figura 33A**) [308]. El ARN genómico, monocatenario de polaridad positiva de aproximadamente 11 kb, contiene un único ORF y codifica para una poliproteína que se escinde por proteasas virales y celulares en tres proteínas estructurales: la proteína de la cápside (C), la proteína de pre-membrana (prM) y la glicoproteína de la envoltura (E); y siete proteínas no estructurales: NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B y NS5 (**Figura 33B**) [307]. El ARN genómico también posee 2 regiones no codificantes, conocidas como la región no traducida (UTR) 5' y UTR 3', que están altamente estructuradas y juegan un papel esencial en la replicación viral [309].

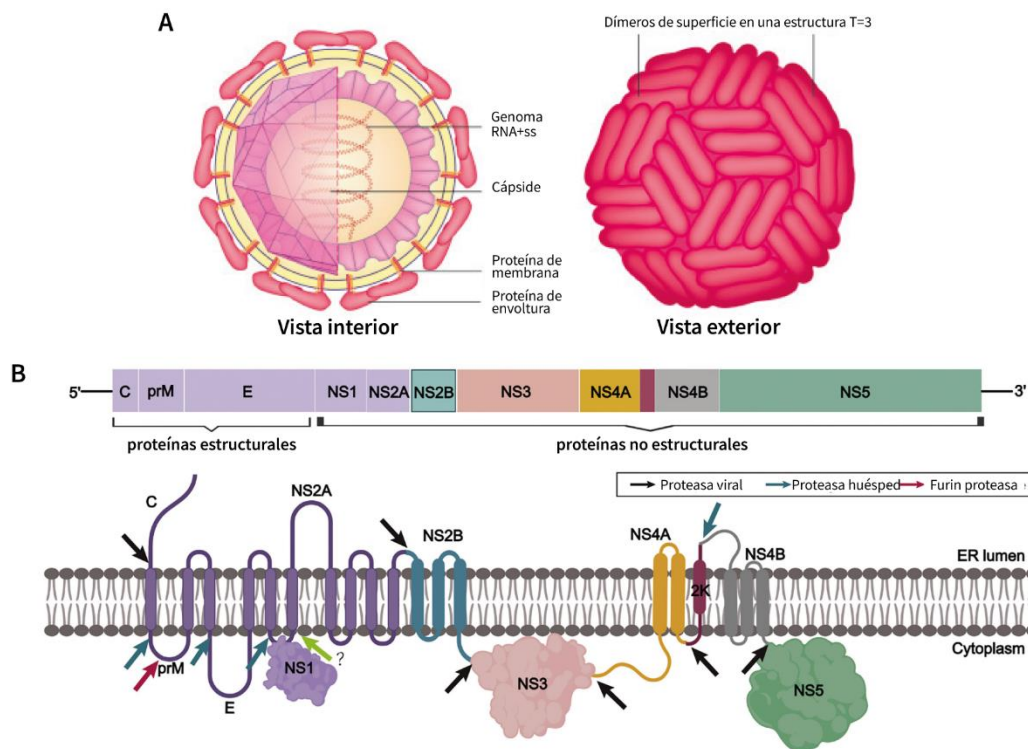


Figura 33. (A) Estructura del virión de un flavivirus, representando la vista interior y exterior del mismo. (B) Genoma de los flavivirus y procesamiento de la poliproteína insertada en la membrana del retículo endoplásmico. Figura modificada de Zeng *et al.* y Payne [310], [311].

Dentro de las proteínas estructurales, la glicoproteína E es una proteína organizada en 3 dominios (E-DI, E-DII y E-DIII), anclada en la membrana viral y responsable de la interacción del virus con el receptor celular y de la entrada del virus a la célula. La

proteína prM actúa como chaperona para la proteína E durante la maduración del virus, evitando la fusión prematura del virus con las membranas celulares durante su ensamblaje en la célula hospedadora [312]. Durante el tránsito de los viriones inmaduros por el aparato de Golgi, serina proteasas tipo furina clivan la proteína prM a M generando formas del virión infeccioso maduro [313]. Por último, la proteína C es una pequeña proteína helicoidal (12 kDa), responsable del reconocimiento y ensamblaje del ARN viral y de la formación de la nucleocápside [314].

Las proteínas no estructurales controlan, coordinan y regulan varios procesos intracelulares del ciclo viral y además están involucradas en la modulación de la respuesta inmune (**Tabla 10**) [315].

Tabla 10. Características y funciones de las proteínas no estructurales de DENV.

	Características	Función	Ref.
NS1	<ul style="list-style-type: none"> • Presente anclada en el RE, asociada a la membrana o secretada (NS1s) • Existen diferentes formas oligoméricas (dímero, tetramero, hexámero) • Proteína glicosilada de 48 kDa • Marcador temprano de la infección viral 	<ul style="list-style-type: none"> • NS1 intracelular está involucrada en la replicación temprana del ARN viral • NS1s se relaciona con la patogenicidad de la enfermedad al promover la permeabilidad vascular y respuestas pro-inflamatorias 	[316], [317], [318]
NS2A	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína integral de membrana hidrofóbica de aproximadamente 22 kDa 	<ul style="list-style-type: none"> • Involucrada en la replicación viral • Orquesta la morfogénesis de las partículas virales mediante la interacción con las proteínas virales prM y E, la regulación del procesamiento de la poliproteína C-prM por la proteasa viral y el reclutamiento del ARN genómico a través de su unión con la región 3' UTR 	[318]
NS2B	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína pequeña hidrofóbica de 14 kDa 	<ul style="list-style-type: none"> • Co-factor para la actividad proteasa de la proteína NS3 • Involucrada en la evasión de la respuesta inmune innata antiviral 	[319], [320]
NS3	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína multifuncional con diversos dominios catalíticos de 68 kDa 	<ul style="list-style-type: none"> • El dominio de serina proteasa (N-terminal) es responsable del procesamiento de la poliproteína viral • El dominio C-terminal posee actividad de helicasa de ARN y NTPasa 	[321], [322], [323], [323]

NS4A	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína integral de membrana hidrofóbica de 16 kDa • Componente integral del complejo de replicación 	<ul style="list-style-type: none"> • Requerida para la modulación de la membrana y la formación de vesículas • Posible rol en la replicación viral 	[324], [325], [326], [327]
NS4B	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína hidrofóbica de 27 kDa 	<ul style="list-style-type: none"> • Involucrada en la replicación viral • Promueve la disociación del ARN simple cadena de NS3, aumentado la actividad helicasa de este dominio • Suprime señalización de IFNβ e IFNγ 	[328], [329], [330], [331]
NS5	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína de aproximadamente 103 kDa y conservada entre serotipos 	<ul style="list-style-type: none"> • El dominio metiltransferasa y GTPasa (N-terminal) está involucrado en el <i>capping</i> del ARN viral • El dominio ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp, C-terminal) está involucrado en la replicación viral 	[332]

1.2. Ciclo de replicación del virus del dengue

El virus del dengue infecta principalmente células del sistema inmune, como células dendríticas, monocitos, macrófagos, linfocitos, entre otras [333], [334], [335]. Aunque aún no se ha identificado un receptor específico de entrada para DENV, el virus puede utilizar múltiples receptores o mecanismos para mediar la infección. Entre los receptores candidatos, se ha observado que las partículas virales se unen a las células a través de la molécula de adhesión intracelular-3 no integrina específica de células dendríticas (DC-SIGN), el receptor de manosa de los macrófagos, los glucosaminoglicanos como el sulfato de heparina y las lectinas, las proteínas inducidas por estrés como las proteínas de choque térmico 70 y 90, y la chaperona del ER GRP78 [336], [337], [338], [339], [340]. Luego de la unión del virus a la célula, el mismo se internaliza en endosomas a través de la endocitosis mediada por clatrina, al igual que otros flavivirus (**Figura 34**) [341]. Sin embargo, dependiendo del serotipo y la célula blanco, DENV puede utilizar un mecanismo de internalización celular alternativo e independiente de clatrina [342].

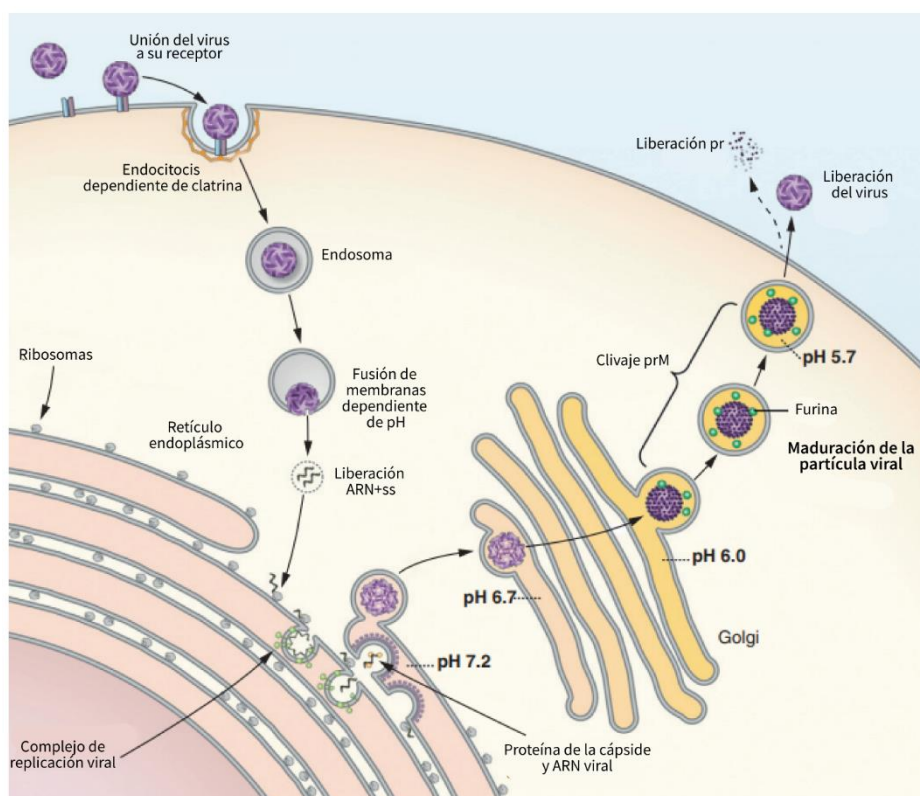


Figura 34. Ciclo de replicación del virus del dengue. Fuente: Pierson *et al.* [343]

Una vez dentro del endosoma, el pH ácido del mismo induce cambios conformacionales en la proteína E del virus, permitiendo la fusión de las membranas, el desensamblaje de la nucleocápside de DENV y la liberación del genoma viral al citoplasma de la célula [344], [345]. En el citoplasma, el genoma viral se traduce en el RE como una única poliproteína que es procesada por proteasas virales (NS2B-NS3) y proteasas de la célula hospedadora en 10 proteínas virales [346], [347]. Las proteínas virales recién sintetizadas reorganizan la membrana del RE en membranas “convolutas” y vesículas [348]. Dentro de estas vesículas se forman los complejos de replicación viral compuestos por las siete proteínas no estructurales que reclutan el ARNV [349]. La proteína NS5 interactúa con el extremo 5' del genoma e inicia la síntesis de este [350]. El ARNV recién sintetizado es empaquetado por la proteína C para formar la nucleocápside y brota hacia la luz del RE, adquiriendo una membrana lipídica que contiene heterodímeros de las proteínas prM y E, formando partículas inmaduras [348].

Estas partículas virales inmaduras son transportadas a través del aparato de Golgi, donde los cambios de pH y la escisión de prM mediada por furina conducen a la maduración del virión [351], [352]. Finalmente, las partículas infecciosas son liberadas de la célula por exocitosis para continuar con el ciclo infeccioso e infectar nuevas células.

1.3. Epidemiología del dengue

La enfermedad o fiebre del dengue (DF) representa la enfermedad viral transmitida por mosquitos que se propaga más rápidamente por el mundo. Los primeros reportes de la gravedad de la enfermedad datan de los años 1779 y 1780, cuando se produjeron grandes epidemias en diferentes regiones de Asia, África y América del Norte [353]. Desde entonces y hasta 1940, las manifestaciones de la enfermedad eran poco frecuentes y la propagación del agente causal estaba limitada, debido a que tanto el virus como su mosquito vector solo podían ser transportados entre poblaciones por vía marítima [354].

La situación epidemiológica cambió drásticamente con la llegada de la Segunda Guerra Mundial, en donde los cambios ecológicos y los movimientos de tropas y refugiados impulsaron la expansión geográfica tanto del vector como del DENV [355]. Esto condujo a la aparición de epidemias en nuevas regiones, como África Oriental, el Caribe y el sudeste asiático, la circulación simultánea de múltiples serotipos del virus y el surgimiento de nuevas formas graves de la enfermedad, como la fiebre hemorrágica del dengue (DHF), lo que incrementó drásticamente la mortalidad y morbilidad. Tras el fin de la Segunda Guerra Mundial, no se registraron epidemias de dengue fuera del sudeste asiático por aproximadamente dos décadas. La ausencia de DENV en las Américas se originó gracias a los programas de erradicación del mosquito *Aedes aegypti* implementados para combatir la fiebre amarilla. Sin embargo, al cesar estas medidas, las poblaciones del mosquito se recuperaron rápidamente, lo que facilitó el resurgimiento del dengue en la región [355].

Hacia finales de los años 90, los brotes de dengue no solo continuaron aumentando en frecuencia, sino también en intensidad debido a la globalización, el crecimiento de la población y los programas ineficientes de control del vector [355], [356]. A lo largo de los últimos 20 años, el número de casos de DF y muertes reportadas han mostrado un incremento significativo, multiplicándose por más de 8 y 4 veces, respectivamente (**Figura 35**) [356]. En el año 2000, se reportaron 505.430 casos de dengue a nivel mundial, una cifra que para 2010 se había incrementado a más de 2,4 millones y en 2019 superó los 5,2 millones [357]. Este incremento en la incidencia estuvo acompañado de un aumento en la mortalidad: las muertes reportadas ascendieron de 960 en 2000 a 4.035 en 2015.

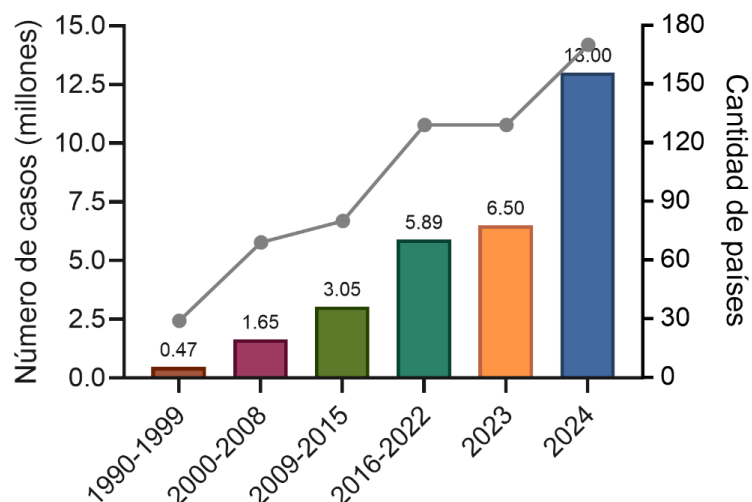


Figura 35. Número de casos de DENV reportados a nivel global entre 1990 y 2024. Adaptado de WHO [358], [359].

Durante el año 2023, la transmisión sostenida de DENV alcanzó una cifra histórica, con más de 6,5 millones de casos y más de 7.300 muertes en más de 80 países [359]. De ese total, cerca del 80% de los casos (4,1 millones) se notificaron en la Región de las Américas, lo que subraya el enorme impacto que el dengue continúa teniendo en esta área. Desde el inicio del 2024, los números han seguido incrementándose dramáticamente, superando ya los 13 millones de casos de DF y más de 8500 muertes relacionadas globalmente [360]. La Región de las Américas continúa siendo la más afectada, con aproximadamente 11,9 millones de casos confirmados [361]. Anteriormente, los brotes de DENV mostraban un patrón cíclico de 3 a 4 años, sin embargo, en los últimos años se ha observado una transmisión más continua y menos marcada por intervalos interepidémicos.

Hoy en día, la enfermedad es endémica en 129 países, con evidencia de casos y brotes reportados, incluyendo 36 países en los que el virus no había circulado previamente [362]. Este panorama epidemiológico se complica aún más debido a la co-circulación de diferentes serotipos de DENV en zonas endémicas, lo que aumenta la probabilidad de que las personas desarrollen formas más graves de la enfermedad debido a la infección secuencial con diferentes serotipos [363].

En Argentina, la epidemiología del dengue ha evolucionado de manera preocupante, transformándose de una enfermedad poco frecuente a un problema de salud pública recurrente. Inicialmente, los casos se limitaban al norte del país, pero con el tiempo el

virus ha ido extendiéndose hacia otras regiones, y actualmente 18 de las 23 provincias reportan casos autóctonos de dengue [364], [365].

El brote de 2009 fue el mayor registrado hasta esa fecha, con 26.923 casos confirmados de DENV-1 en 14 provincias, de las cuales 10 no tenían antecedentes epidemiológicos de la enfermedad [366]. Esto marcó el inicio de la propagación del virus más allá de las regiones históricamente endémicas del norte del país. A principios de 2016, un nuevo brote de DENV superó significativamente al de 2009, con un aumento del 49% en los casos reportados [366]. Este brote se caracterizó por la introducción del serotipo 4 en el país y la expansión del mismo a una nueva provincia [367]. Sin embargo, los últimos dos años marcaron un récord histórico en el país en cuanto casos de DF, con alrededor de 129.500 casos confirmados en la temporada 2022/2023 y 566.140 casos reportados para la temporada 2023/2024, reflejando una transmisión sostenida y un aumento en la mortalidad asociada [365], [368].

1.4. Presentación clínica

La enfermedad causada por la infección con DENV presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas, que van desde infecciones asintomáticas o con síntomas febriles leves, hasta formas graves que pueden poner en riesgo la vida de la persona infectada [358]. Luego de un periodo de incubación de 4 a 10 días desde la picadura del mosquito infectado, la mayoría de los pacientes desarrolla una infección asintomática (aproximadamente un 75%), mientras que los pacientes sintomáticos suelen presentar síntomas que aparecen abruptamente, seguidos por las tres fases clásicas de la enfermedad: febril, crítica y de recuperación [358].

La fase febril, que puede durar de 2 a 7 días, se presenta como una enfermedad autolimitada caracterizada por fiebre alta, dolor muscular, dolor retroocular, cefalea y erupciones cutáneas [369], [370]. En la mayoría de los casos, esta fase se resuelve sin complicaciones y se clasifica como dengue sin signos de alarma. Sin embargo, en algunos pacientes el curso clínico puede progresar a la fase crítica de la enfermedad, que se caracteriza por el aumento de la permeabilidad vascular, lo que conlleva a la aparición de signos de alarma como dolor abdominal severo, vomito persistente, acumulación de líquidos y sangrado de las mucosas [371], [372], [373]. Durante la fase crítica, la enfermedad puede evolucionar a una forma más severa y letal de la enfermedad, conocida como dengue severo [373]. El mismo, que afecta entre el 2% y el 5% de los

pacientes, se caracteriza por una mayor permeabilidad vascular, hemorragias severas y compromiso grave de varios órganos [358]. Durante la fase de recuperación, que dura entre 48 y 72 hs, los signos vitales se estabilizan, la permeabilidad vascular disminuye y los líquidos extravasados son reabsorbidos.

Un aspecto relevante en la severidad del dengue es el rol de la proteína NS1, cuya alta concentración en las etapas tempranas de la infección se ha correlacionado con una mayor permeabilidad vascular, característica distintiva de las formas más graves de dengue [374]. Diversos estudios han demostrado que NS1 promueve la pérdida de la integridad de la barrera vascular en células endoteliales y la activación del sistema de complemento, lo que a su vez estimula la liberación de citocinas inflamatorias, exacerbando la fuga capilar y la disfunción endotelial [375], [376], [377], [378], [379]. Estas observaciones se han confirmado en varios estudios hospitalarios de diferentes regiones, que muestran una correlación positiva entre los niveles elevados de NS1 y la aparición de dengue severo, con valores de NS1 significativamente más altos en pacientes que desarrollaron complicaciones graves en comparación con aquellos con formas leves de la enfermedad [380], [381], [382], [383]. Es decir, la presencia de altos niveles de NS1 en la fase inicial de la infección puede predecir un curso clínico más complicado.

1.5. Diagnóstico de la infección

El diagnóstico rápido y preciso de DENV es esencial no solo para el manejo clínico adecuado de los pacientes, sino también para la vigilancia epidemiológica y el monitoreo efectivo de brotes [384]. Los métodos de diagnóstico disponibles incluyen diferentes técnicas moleculares o serológicas, cuya elección depende de los recursos disponibles y la evolución de la enfermedad (**Tabla 11**). Aunque el diagnóstico clínico puede orientar la identificación de casos sospechosos, la confirmación mediante una prueba de laboratorio es fundamental para evitar confusiones con otras enfermedades febriles agudas, muchas de ellas producidas por otros flavivirus.

Tabla 11. Resumen de los métodos de diagnóstico para DENV y características asociadas.

Método de diagnóstico	Ventana de diagnóstico (desde el inicio de síntomas)	Tiempo hasta el resultado	Muestra	Instalaciones necesarias	Costo
Aislamiento viral	1-5 días	1-2 semanas	Suero, plasma, PBMCs o tejidos	Laboratorio especializado	\$\$\$

Detección de ácidos nucleicos	1-7 días	< 24 hs	Suero, plasma o tejidos	Laboratorio molecular	\$\$\$
Detección de antígenos	1-9 días	< 24 hs	Suero	Básico o laboratorio molecular	\$
Detección serológica IgM	> 5 días hasta 12 semanas	< 24 hs	Suero o plasma	Básico o laboratorio molecular	\$
Detección serológica IgG	> 7 días (infección primaria); > 1 día (infección secundaria)	< 24 hs	Suero o plasma	Básico o laboratorio molecular	\$

Hoy en día, la detección antigénica de NS1 es uno de los métodos más utilizados para el diagnóstico agudo del dengue, al igual que los métodos de amplificación de ácidos nucleicos o las pruebas de IgM [385]. La proteína NS1 es un biomarcador muy útil, ya que se libera al torrente sanguíneo durante los primeros días de la infección, permitiendo su detección hasta más de 9 días del inicio de los síntomas [317], [386]. Las concentraciones de NS1 en sangre varían típicamente de 0,1 a 1 µg/ml, aunque en ciertos casos se han reportado niveles de hasta 50 µg/ml, en donde la NS1 sigue siendo detectable hasta 14 días del inicio de la fase febril [386], [387], [388], [389].

Entre las ventajas del uso de ensayos de NS1 para el diagnóstico del dengue se encuentran su alta especificidad, lo que permite diferenciar la infección por dengue de otros flavivirus que circulan de manera simultánea en regiones endémicas, minimizando el número de falsos positivos [390], [391]. Además, la detección de NS1 permite identificar la infección desde el primer día de inicio de los síntomas, antes de la seroconversión a IgM [373]. Los ensayos de ELISA de captura y pruebas de diagnóstico rápido (RDTs) desarrollados y disponibles en el mercado permiten detectar este antígeno viral en minutos (15-20 min para RDTs) u horas (3-4 hs para ELISA), lo que resulta ventajoso para la toma de decisiones clínicas inmediatas [392]. Estas pruebas no precisan de equipamiento costoso ni sofisticado, lo que facilita su aplicación tanto en entornos urbanos como rurales. Sin embargo, estos ensayos no permiten identificar el serotipo viral causante de la infección y el rendimiento diagnóstico de los mismo varía dependiendo el serotipo [393]. En infecciones secundarias, la formación de complejos inmunes entre NS1 y los anticuerpos preexistentes puede reducir la ventana de detección y, en consecuencia, la sensibilidad del ensayo [394], [395]. En Argentina, los *kits* comerciales de detección de NS1 son importados, lo que incrementa los costos y dificulta

su acceso universal, especialmente en áreas de recursos limitados. Esto destaca la necesidad de desarrollar opciones diagnósticas accesibles y específicas para el contexto regional.

2. Objetivos

Dado el continuo impacto del dengue en países como Argentina, donde los casos han aumentado significativamente en los últimos dos años, implementar medidas de detección temprana puede marcar la diferencia en el control y manejo de la enfermedad. Por lo tanto, el objetivo general de este capítulo consistió en **desarrollar un ensayo diagnóstico basado en Nbs anti-NS1 que permita la detección temprana de individuos infectados con DENV**.

Los objetivos específicos de este trabajo fueron:

- 1) Expresar y purificar Nbs anti-NS1 para evaluar su especificidad y afinidad mediante técnicas de caracterización molecular o bioquímicas.
- 2) Modificar Nbs anti-NS1 para mejorar sus propiedades como anticuerpos de captura y detección.
- 3) Poner a punto la técnica de ELISA utilizando Nbs anti-NS1, con el objetivo de capturar y detectar de manera específica la proteína NS1 utilizando proteína recombinante y muestras de suero de individuos infectados con DENV.
- 4) Evaluar y comparar la sensibilidad y especificidad del ensayo de detección de NS1 desarrollado con las características de *kits* comerciales basados en anticuerpos monoclonales.

3. Antecedentes

Nuestro grupo de investigación seleccionó previamente 11 Nbs únicos dirigidos contra la proteína NS1 de los serotipos 1 y 2 de DENV (NS1-1 y NS1-2, respectivamente). Para ello, se inmunizó una llama con sobrenadante purificado, proveniente de células de mosquito infectadas con los 4 serotipos del virus. Esta estrategia para producir la proteína NS1 fue seleccionada considerando el trabajo de Flamand *et al.*, quienes informaron que la principal forma soluble de NS1 en las condiciones de cultivo celular aplicadas era una especie hexamérica y que de 5 a 10 µg/ml de la proteína se liberaban al sobrenadante después de la infección [396], [397].

Después de cinco inmunizaciones, se tomó una muestra de sangre de la llama para extraer células mononucleares periféricas y se construyó una biblioteca de 1×10^8 clones individuales. A continuación, se seleccionaron Nbs específicos para NS1-1 y NS1-2 mediante biopaneos en fase sólida utilizando dos estrategias: placas de ELISA sensibilizadas con proteína NS1-1 recombinante o conteniendo células Vero transfectadas con un plásmido que expresa la NS1-2. En el protocolo se incluyeron pasos de contra-selección para reducir la unión inespecífica de fagos, ya que la llama fue inmunizada con sobrenadante que contenía varias proteínas. Se amplificaron 96 clones (del 1 al 48, seleccionados con proteína NS1-1 recombinante, y del 49 al 96, seleccionados con plásmido NS1-2 transfectado) y posteriormente se sometieron a análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) utilizando la enzima de restricción *HinfI* para determinar clones diversos.

El análisis de secuencias RFLP de 96 clones reveló al menos 18 patrones de restricción diferentes. Los plásmidos se enviaron para secuenciación y se analizaron las secuencias obtenidas. Este análisis reveló la existencia de 11 Nbs diferentes con la conservación esperada de residuos en los FRs y alta variabilidad en los CDRs. Considerando esta información, se seleccionaron los Nb-5, Nb-7, Nb-14, Nb-22, Nb-34, Nb-40, Nb-48, Nb-51, Nb-54, Nb-66 y Nb-70 para continuar trabajando en este estudio.

4. Resultados

4.1. Producción y purificación de las proteínas recombinantes NS1 de los 4 serotipos de DENV

Para el desarrollo de un ensayo de ELISA para la detección de NS1 es fundamental contar con proteína NS1 recombinante de alta pureza y en cantidades suficientes, que permitirán la puesta a punto del ensayo diagnóstico, previo a la validación con las muestras de pacientes infectados con dengue. Por este motivo, en primer lugar, se produjeron de manera recombinante estas proteínas.

Los plásmidos de expresión que codifican para las proteínas NS1 de los 4 serotipos de dengue fueron generados previamente en el laboratorio. Estas secuencias se encuentran clonadas en el vector pCAGGS que contiene la señal de secreción de la albumina sérica humana y una etiqueta de 6 histidinas (6xHis) en el extremo C-terminal [398].

Estos plásmidos se transfectaron transitoriamente en células adherentes HEK-293T utilizando PEI y las proteínas recombinantes se purificaron mediante IMAC. Las fracciones obtenidas durante la purificación se sometieron a SDS-PAGE (**Figura 36**), para ser analizadas mediante *Western blot* y tinción con azul de *Coomassie*. En las eluciones de la purificación se detectaron al menos dos bandas de aproximadamente 45 y 50 kDa, que corresponden al PM esperado y a las variantes de glicosilación de la proteína NS1 recombinante. El rendimiento en la producción de estas proteínas varió entre 1,6 mg/l y 1,8 mg/l, estos valores fueron considerados bajos para la cantidad de proteína necesaria para el desarrollo de un *kit* diagnóstico.

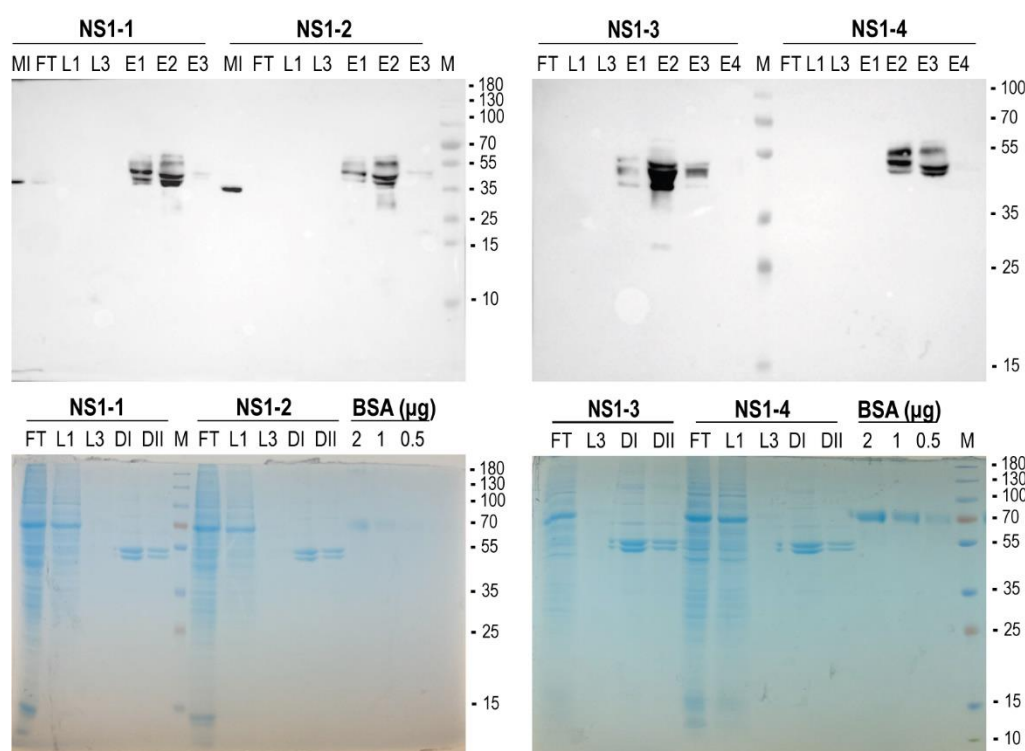


Figura 36. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes NS1 de los 4 serotipos de dengue. Perfiles proteicos en diferentes etapas de la purificación de NS1 en membranas de nitrocelulosa reveladas mediante *Western blot* (panel superior) y geles SDS-PAGE teñido con azul de *Coomassie* (panel inferior). MI: muestra inicial antes de pasar por la resina. FT: fracción no unida a la resina. L1 y L3: lavados. E1, E2, E3 y E4: eluciones. DI y DII: diluciones de la proteína a cuantificar. M: marcador de PM en kDa.

4.1.1. Subclonado de secuencias codificantes para la proteína NS1 de los 4 serotipos de DENV en el vector pFUSEss para mejorar la expresión de las proteínas

Con el fin de mejorar los rendimientos en la expresión de las proteínas recombinantes, las secuencias codificantes para la NS1 se subclonaron en una versión modificada del

vector pFUSEss, que contiene una señal de secreción de interleuquina 2 (IL-2) y una etiqueta FLAG (DYKDDDDK) en el extremo N-terminal y dos etiquetas en el extremo C-terminal: c-myc y 6xHis (**Figura 37A**).

Para ello se amplificaron las secuencias de la NS1 de los 4 serotipos de DENV y un fragmento (F), conteniendo parte del vector de origen y las dos etiquetas presentes en el extremo C-terminal (**Figura 37B**). Cada reacción se realizó utilizando *primers* que hibridan en la secuencia de interés (NS1 o F) y contienen al menos 15 pb complementarias al vector en donde se quiere insertar para permitir la generación de esta nueva construcción mediante *Infusion Cloning* (**Figura 37C**).

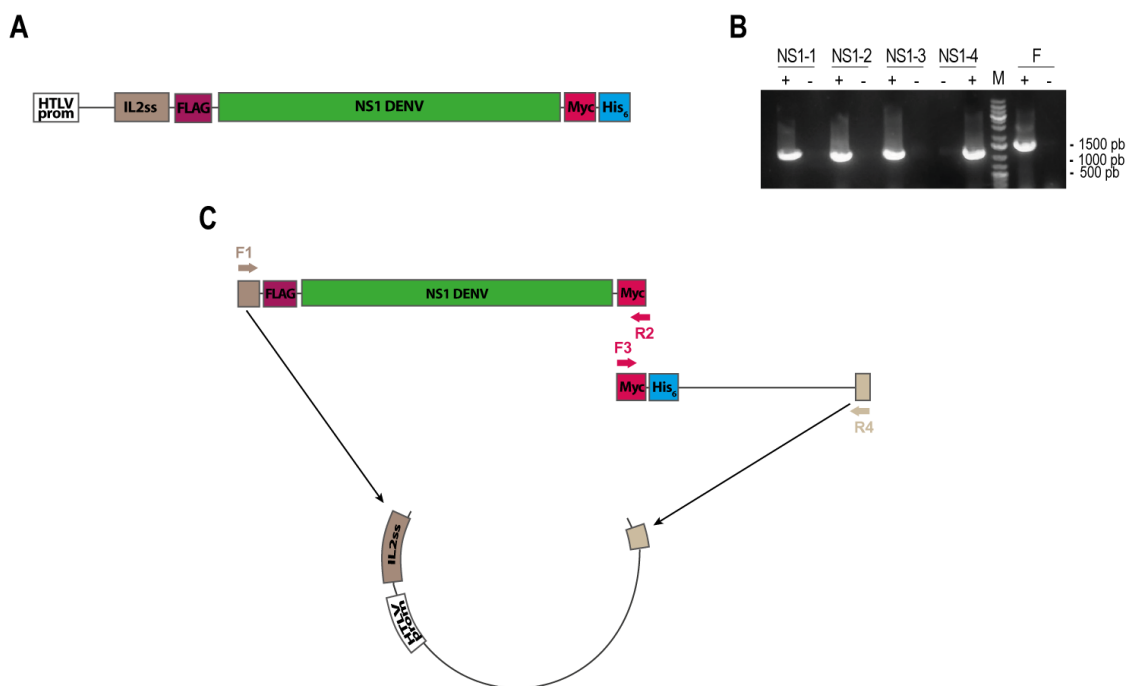


Figura 37. Generación del plásmido de expresión NS1 pFUSEss de los 4 serotipos de DENV para mejorar la expresión de la proteína recombinante. (A) Diagrama esquemático de la construcción generada para la expresión y purificación de NS1. (B) Amplificación del ADN correspondiente a las secuencias de NS1 de los 4 serotipos de DENV a partir del vector pCAGGS y del fragmento, denominado F, que contiene dos etiquetas de c-myc y 6xHis. El signo + refiere a la amplificación de la secuencia de interés mientras que el signo - corresponde al control negativo de esa reacción. M: marcador de PM de ADN en pares de bases. (C) Estrategia de clonado para la generación del nuevo vector mediante *Infusion Cloning*.

4.1.2. Comparación de los niveles de expresión en ambos vectores

Una vez generado este nuevo grupo de vectores, se expresaron a baja escala las proteínas recombinantes provenientes de ambas construcciones (pCAGGS y pFUSEss), con el fin de comparar los niveles de expresión. Para ello se transfectaron los plásmidos de

expresión en células HEK-239T sembradas en placas de 6 pocillos y se recolectaron los sobrenadantes y *pellet* de células 72 hs post-transfección. Las muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE y *Western blot*.

Se observó así que las proteínas NS1 de los 4 serotipos de dengue se expresan en mayor cantidad en el sobrenadante de las células transfectadas al utilizar la nueva construcción, ya que se evidencian 4 bandas intensas de aproximadamente 50 kDa, correspondiente al PM esperado de la proteína NS1 (**Figura 38A**). Además, se comprobó que la nueva construcción permite una mayor expresión de la NS1-1 y NS1-2 en el *pellet* de las células transfectadas (**Figura 38B**).

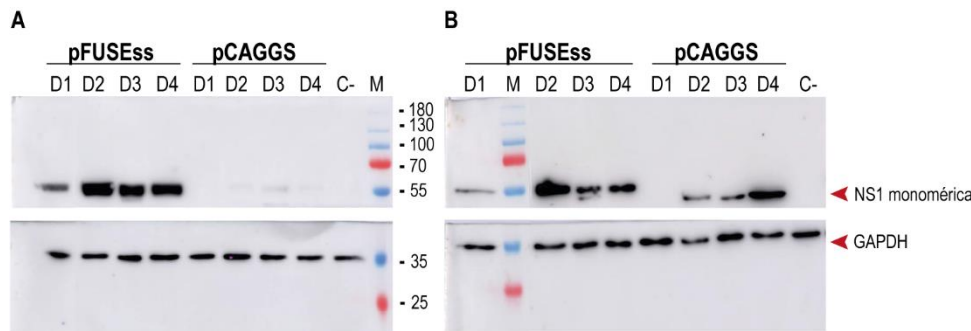


Figura 38. Comparación de los niveles de expresión de la proteína NS1 de los 4 serotipos de DENV (D1-D4) utilizando la construcción nueva o mejorada (pFUSEss) y el vector viejo u original (pCAGGS). Análisis mediante *Western blot* de la expresión de NS1 y del gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, control de carga) en el sobrenadante (A) y *pellet* (B) de células transfectadas.

A partir de los resultados obtenidos, se escaló la producción de las proteínas y se purificaron, tal como se describió anteriormente. En promedio, las proteínas expresadas a partir del vector pFUSEss mostraron un rendimiento de aproximadamente el doble que las expresadas a partir del vector pCAGGS (**Tabla 12**).

Tabla 12. Comparación en los rendimientos de las proteínas recombinantes purificadas.

Vector	Proteína	Rendimiento (mg/l)
pCAGGS	NS1-1	1,6
	NS1-2	1,8
	NS1-3	1,65
	NS1-4	1,7
pFUSEss	NS1-1	3,4
	NS1-2	5
	NS1-3	4,3
	NS1-4	3,8

4.1.3. Análisis de las proteínas recombinantes de ambos vectores mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC-HPLC)

A continuación, se estudió la presencia de diferentes formas oligoméricas de la proteína recombinante NS1-2 mediante un análisis de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) en HPLC de las proteínas expresadas a partir de los dos vectores (pCAGGS y pFUSEss). Durante la corrida de la proteína proveniente del vector pCAGGS se observaron dos picos principales en el cromatograma que se eluyeron aproximadamente a los 28,2 y 31,1 minutos (**Figura 39A**, línea rosa). Estos tiempos de elución corresponden a proteínas de 270,62 y 90,66 kDa, respectivamente, según la calibración de la columna, indicando la presencia de formas hexaméricas y diméricas.

Por otro lado, se observó un único pico en el cromatograma de NS1-2 proveniente del vector pFUSEss que se eluyó aproximadamente a los 30,1 minutos (**Figura 39A**, línea violeta). Este pico representa la presencia de una proteína trimérica de 130,6 kDa, que difiere de lo reportado sobre las especies oligoméricas de NS1 [399], [400].

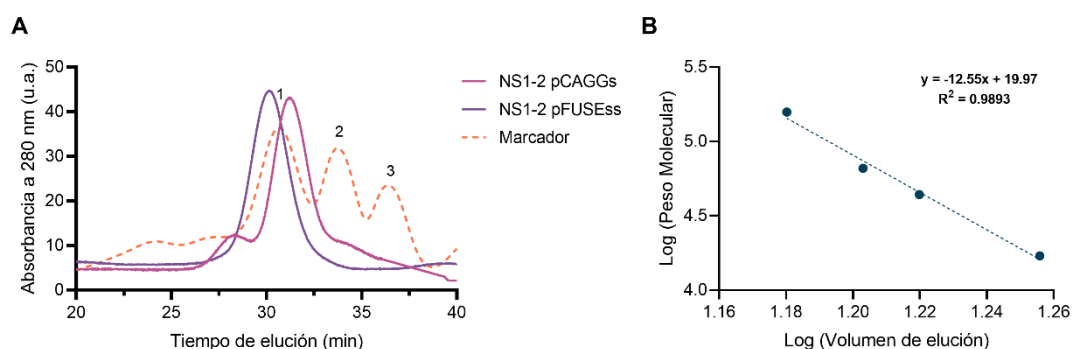


Figura 39. Comportamiento hidrodinámico de NS1-2 de ambos vectores. **(A)** SEC-HPLC de NS1-2 recombinante proveniente del vector pCAGGS (rosa) o pFUSEss (violeta) y de marcadores de PM (línea naranja discontinua). **(B)** Correlación entre el logaritmo del PM y el logaritmo del volumen de elución obtenido a partir de los marcadores de PM: (1) gammaglobulina (158 kDa), BSA monomérica (66 kDa), (2) ovoalbúmina (44 kDa) y (3) mioglobina (17kDa).

4.2. Caracterización de los Nbs

4.2.1. Análisis filogenético de las secuencias de Nbs

Para analizar y caracterizar los Nbs seleccionados se realizaron diferentes análisis utilizando herramientas bioinformáticas que permiten clasificar las secuencias de los Nbs y evaluar su origen germinal. Este análisis resulta fundamental para determinar con qué Nbs continuar trabajando en etapas posteriores y para correlacionar los resultados

obtenidos con su origen germinal. A partir del análisis filogenético de los Nbs, las secuencias se clasificaron en 3 grupos diferentes (**Figura 40**). El grupo 1 incluye los Nbs 5, 34, 51 y 66, los cuales se caracterizan por tener un CDR3 de 18 AA de longitud. El mismo está formado por el 36,36% de los clones (4 de 11). Considerando la información del origen germinal, este grupo muestra una alta consistencia en el uso del gen V 3-3*01 para ambos programas utilizados y del gen J 4*01 o 2*01/3*01 según el programa *IMGT/V-QUEST* o *IMGT/DomainGapAlign* respectivamente; mientras que los genes D presentan cierta variabilidad. Este patrón de uso de genes sugiere una fuerte relación filogenética y posibles similitudes en la función y especificidad de estos Nbs. Además, la estrategia de biopaneamiento utilizada, que incluye tanto el biopaneamiento con NS1-1 recombinante sensibilizada en el pocillo como con células transfectadas con el plásmido para NS1-2, ha sido eficaz en la selección de Nbs con características genéticas convergentes.

El grupo 2 está representado por los Nbs 48 y 54 (**Figura 40**). Ambos utilizan el gen V 3-3*01 según los dos programas utilizados, pero muestran variabilidad en el uso del gen J: 4*01 según *V-QUEST* y 2*01 o 6*01 según *DomainGapAlign*. Los genes D identificados por *IMGT/V-QUEST* son 3*01 y 6*01. Comparado con el Grupo 1, este grupo presenta una mayor longitud de CDR3 (21 AA), lo que puede ofrecer una mayor flexibilidad en la unión a los antígenos.

Los Nbs 7 y 22 conforman el tercer grupo, ambos utilizando el gen V 3S53*01 y el gen J 4*01 según los dos programas utilizados. Los genes D presentan variabilidad (1*01 y 2*01) y los CDR3 son notablemente cortos, con una longitud de 10 AA. Esto sugiere una estructura más compacta y posiblemente una mayor especificidad en la unión a sus antígenos.

Por otro lado, los Nbs 14, 40 y 70 presentan características únicas que impiden su clasificación en alguno de los grupos mencionados. Estos Nbs presentan una variabilidad notable en la utilización de genes V, D y J, así como en la longitud de los CDR3, lo que sugiere una diversidad genética y estructural que puede ser esencial para el desarrollo de herramientas diagnósticas y de tratamiento.

Árbol filogenético	ID VHH	IMGT/V-QUEST			IMGT/DomainGapAlign		Largo CDR3	Estrategia Biopaneó
		V-GENE	D-GENE	J-GENE	V-GENE	J-GENE		
	5	3-3*01	5*01	4*01	3-3*01	2*01/3*01	18	NS1-1 (s)
	34	3-3*01	5*01	4*01	3-3*01	2*01/3*01	18	NS1-1 (s)
	51	3-3*01	1*01	4*01	3-3*01	2*01/3*01	18	NS1-2 (t)
	66	3-3*01	5*01	4*01	3-3*01	2*01/3*01	18	NS1-2 (t)
	14	3-3*01	3*01	4*01	3-3*01	2*01	20	NS1-1 (s)
	48	3-3*01	3*01	4*01	3-3*01	2*01	21	NS1-1 (s)
	54	3-3*01	6*01	4*01	3-3*01	6*01	21	NS1-2 (t)
	40	3S63*01	-	4*01	3-3*01	4*01	24	NS1-1 (s)
	7	3S53*01	1*01	4*01	3S53*01	4*01	10	NS1-1 (s)
	22	3S53*01	2*01	4*01	3S53*01	4*01	10	NS1-1 (s)
	70	3S53*01	6*01	4*01	3S53*01	4*01	18	NS1-2 (t)

Figura 40. Análisis filogenético y de origen germinal de los Nbs seleccionados. Las columnas 1 y 2 muestran el árbol filogenético obtenido con la identificación de cada Nb, respectivamente. El origen germinal según los programas *IMGT/V-QUEST* (columnas 3 a 5) e *IMGT/DomainGapAlign* (columnas 6 y 7) muestran el segmento génico (V), el segmento génico de diversidad (D) y el gen de unión (J) para cada Nb. Se utilizan los mismos colores para el origen VDJ similar. La longitud del CDR3 se representa en la columna 8 y la estrategia de biopaneó en la columna 9: pocillos con la proteína NS1-1 sensibilizada (NS1-1 (s)) o células transfectadas con el plásmido que codifica para la NS1-2 (NS1-2 (t)).

4.2.2. Determinación de la afinidad de los Nbs seleccionados

A partir del análisis filogenético de los Nbs se seleccionaron 6 candidatos para continuar con su caracterización: cuatro representantes de cada grupo filogenético (Nb-5, Nb-22, Nb-48 y Nb-66) y dos Nbs con características únicas que no pudieron ser agrupados (Nb-14 y Nb-40). A pesar de múltiples intentos, el Nb-70 no se pudo expresar en las cantidades necesarias para este ensayo y estudios posteriores, por lo que no se siguió trabajando con el mismo.

Para evaluar la especificidad de los anticuerpos seleccionados, se analizó su capacidad de unión mediante ELISA frente a las proteínas recombinantes NS1 de los 4 serotipos de DENV y la proteína NS1 de ZIKV. Todos los Nbs seleccionados poseen una especificidad hacia las proteínas NS1 de DENV, con distintos grados de afinidad relativa según el Nb y/o serotipo evaluado (**Figura 41 y Tabla 13**). En contraste, ninguno de los Nbs mostró reactividad hacia la NS1 de ZIKV (resultados no mostrados).

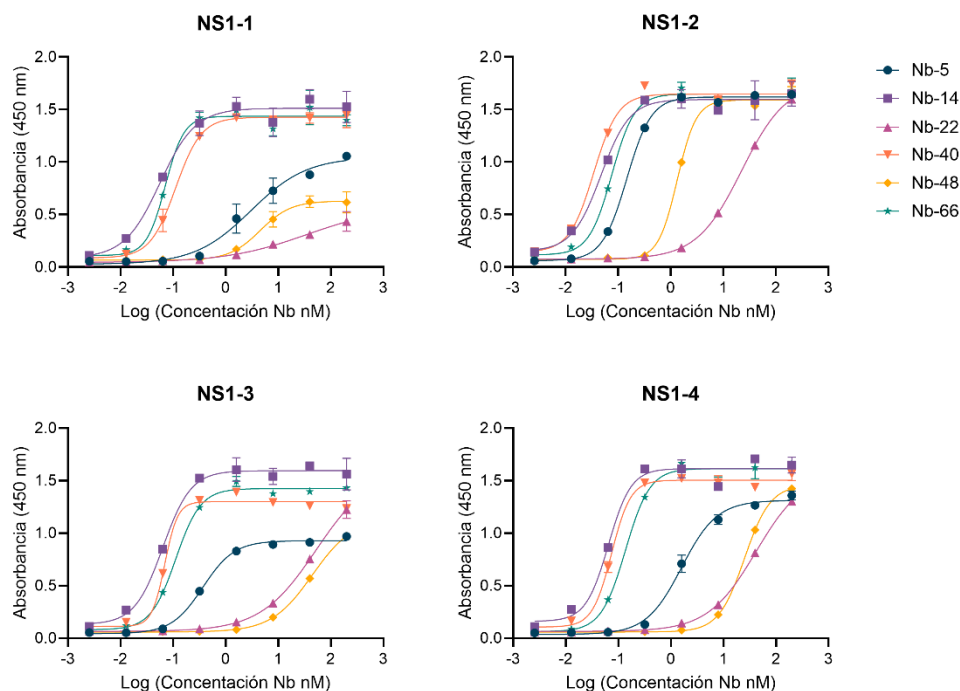


Figura 41. Determinación de la especificidad y afinidad relativa de los Nbs seleccionados hacia la NS1 de los 4 serotipos de DENV. Se asignaron diferentes colores a cada curva según la identidad del Nb. Las barras de error representan la desviación estándar (DE) de triplicados.

Casi todos los Nbs, con excepción del Nb-22, mostraron valores de EC_{50} en el rango nanomolar de un único dígito, lo que indica una fuerte unión a estas proteínas (**Tabla 13**). Los Nb-14, Nb-40 y Nb-66 poseen las afinidades relativas más altas, resaltando su potencial para ser utilizados en el desarrollo del ensayo diagnóstico. Además, se observó que los valores de EC_{50} más bajos para la mayoría de los Nbs se obtuvieron frente a las NS1 de los serotipos DENV-1 y DENV-2. Esta observación es consistente con la estrategia de selección utilizada durante el biopaneado, donde se utilizó proteína NS1-1 recombinante o células Vero transfectadas con un plásmido que expresa la NS1-2.

Tabla 13. Valores de EC_{50} de los Nbs seleccionados.

Nb	EC_{50} (nM)			
	NS1-1	NS1-2	NS1-3	NS1-4
Nb-5	3,031	0,146	0,371	1,603
Nb-14	0,056	0,047	0,063	0,064
Nb-22	35,14	22,51	52,51	41,84
Nb-40	0,112	0,034	0,069	0,074
Nb-48	4,549	1,338	44,59	25,16
Nb-66	0,071	0,076	0,112	0,137

4.3. Modificación de los Nbs para mejorar su capacidad como anticuerpos de captura

Para mejorar las características de los Nbs como anticuerpos de captura, se generaron diversas construcciones que permitieron la modificación de los Nbs. Una de las modificaciones consistió en el acoplamiento a una secuencia de aminoácidos VHWDFRQWWQPS, rica en el aminoácido triptófano, la cual se ha reportado que tiene una afinidad de unión al poliestireno y que denominamos PSW (**Figura 42A**)[401]. Esta modificación tiene como objetivo mejorar la inmovilización del Nb en las superficies de las microplacas, resultando en una captura más eficiente del antígeno.

Dado que los Nbs en su formato monovalente pueden ser inapropiados como moléculas de captura para ensayos tipo ELISA, también se generaron Nbs bivalentes (**Figura 42B**). Para ello, las secuencias de los Nbs se fusionaron genéticamente a través de *linker* de 20 aminoácidos, compuesto por glicinas y serinas. Estos dímeros de Nbs aumentan la avidéz de la molécula, permitiendo una unión más fuerte y estable al antígeno [52].

Como enfoque alternativo para aumentar la avidéz, las secuencias de los Nbs se fusionaron genéticamente al dominio bisagra y Fc de la IgG2a de ratón, reconstituyendo lo que se conoce como un anticuerpo de cadena pesada (**Figura 42C**). Esta modificación, denominada Nb Fc, no solo aumenta la avidéz al antígeno, sino que también mejora la inmovilización del anticuerpo en la superficie de las microplacas gracias a la región Fc.

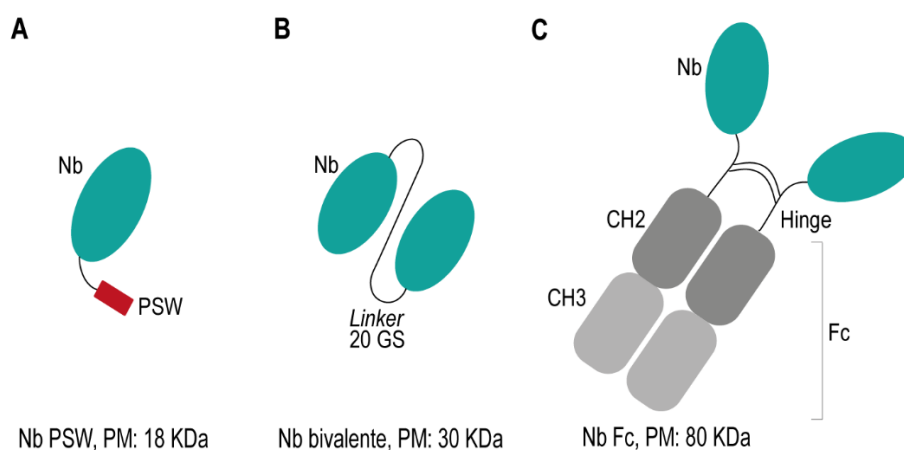


Figura 42. Esquema de los Nbs modificados para la captura de la NS1 de DENV. (A) Los Nbs (turquesa) se acoplaron a una secuencia de pegado a plástico (PSW). (B) Homodímeros del Nb conectados a través de un *linker* de 20 AA compuestos por glicina y serina. (C) Nanoanticuerpos acoplados al dominio Fc de las inmunoglobulinas tipo G de la subclase 2a de ratón.

4.3.1. Subclonado, expresión y purificación de Nbs con secuencia de pegado a plástico (Nbs-PSW)

Los Nbs se clonaron a un vector de expresión procariota que contiene una *pelB*, la secuencia de pegado a plástico PSW en el extremo N-terminal y dos etiquetas en el extremo C-terminal (HA y 6xHis) (**Figura 43A**). Para ello, se amplificaron las secuencias de los Nbs mediante PCR y la construcción del nuevo vector se realizó mediante la técnica de *Infusion Cloning* (**Figura 43B**). Una vez confirmadas la identidad de las nuevas construcciones mediante digestión con enzimas de restricción y secuenciación, los Nbs se expresaron y purificaron desde periplasma mediante cromatografía de afinidad utilizando resina de níquel, obteniendo una pureza superior al 95% (**Figura 43C**).

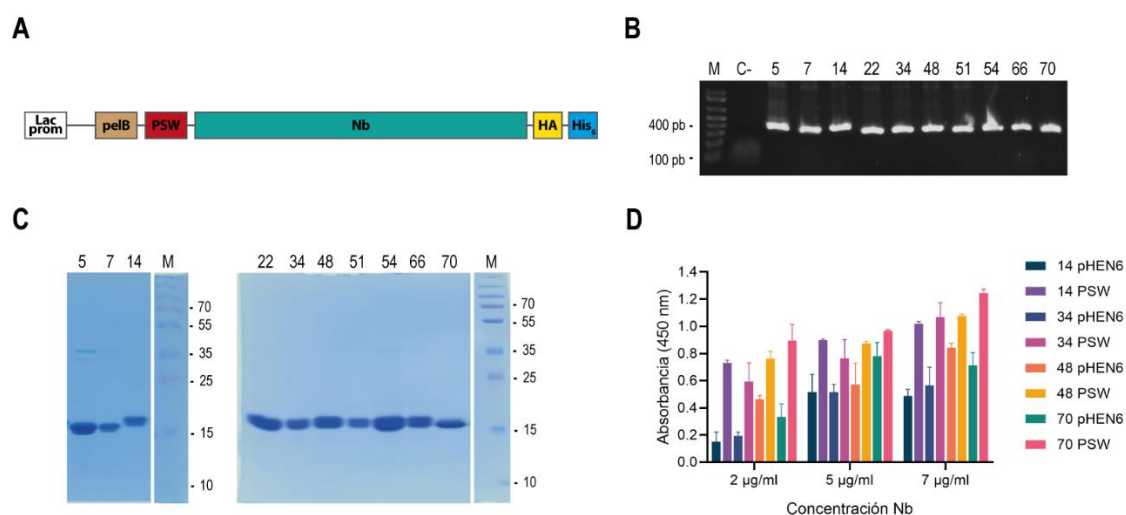


Figura 43. Subclonado, expresión y purificación de los Nbs-PSW. (A) Diagrama esquemático de la construcción generada para la expresión y purificación de los Nbs-PSW. (B) Amplificación del ADN correspondiente a las secuencias de los Nbs a partir del vector pHEN6. M: marcador de PM de ADN en pares de bases. (C) Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de *Coomassie* de los Nbs-PSW purificados. (D) Comparación de la capacidad de unión de los Nbs con o sin secuencia de pegado a plástico a las placas de ELISA.

A su vez, se evaluó la capacidad de diferentes Nbs (Nbs o Nbs-PSW) de adherirse a las placas de ELISA. Los resultados mostraron que, en todas las concentraciones evaluadas, los Nbs-PSW presentaron una mayor absorbancia en comparación con los Nbs sin modificaciones adicionales, indicando una mayor adhesión a las placas de ELISA (**Figura 43D**). Estos resultados confirman la hipótesis de que la secuencia PSW aumenta la capacidad de unión de los Nbs al poliestireno, haciéndolos más prometedores como herramientas de captura de la NS1.

4.3.2. Subclonado, expresión y purificación de Nbs bivalentes

Las secuencias nucleotídicas de los Nbs se clonaron en un vector de expresión procariota que contiene una secuencia de direccionamiento al periplasma *pelB*, un *linker* de 20 AA, compuestos por glicinas y serinas, y una etiqueta 6xHis en el extremo C-terminal (**Figura 44A**). Para generar esta construcción, se utilizó como vector de partida uno disponible en el laboratorio, el cual contenía dos secuencias que codifican para un Nb no relacionado (anti-HA IAV) unidos a través de un *linker* del mismo tamaño. En primer lugar, se amplificaron las secuencias de los Nbs utilizando dos *primers* que hibridan en regiones constantes de los Nbs y contienen 15 pares de bases complementarias al vector, para insertar el segundo Nb de la construcción bivalente mediante *Infusion Cloning* (**Figura 44B**). Una vez obtenida esta construcción, se clonó la secuencia del primer Nb mediante digestión y ligación de los productos de PCR y el vector (**Figura 44C**). Los Nbs bivalentes se expresaron en bacterias *E. coli* WK6 y se purificaron mediante cromatografía de afinidad utilizando una resina de níquel. Todas las fracciones correspondientes a la purificación de estas moléculas se analizaron por SDS-PAGE (**Figura 44D y 12E**). En las eluciones de la purificación, se observó una banda predominante de 30 kDa, correspondiente al PM esperado de los Nbs bivalentes.

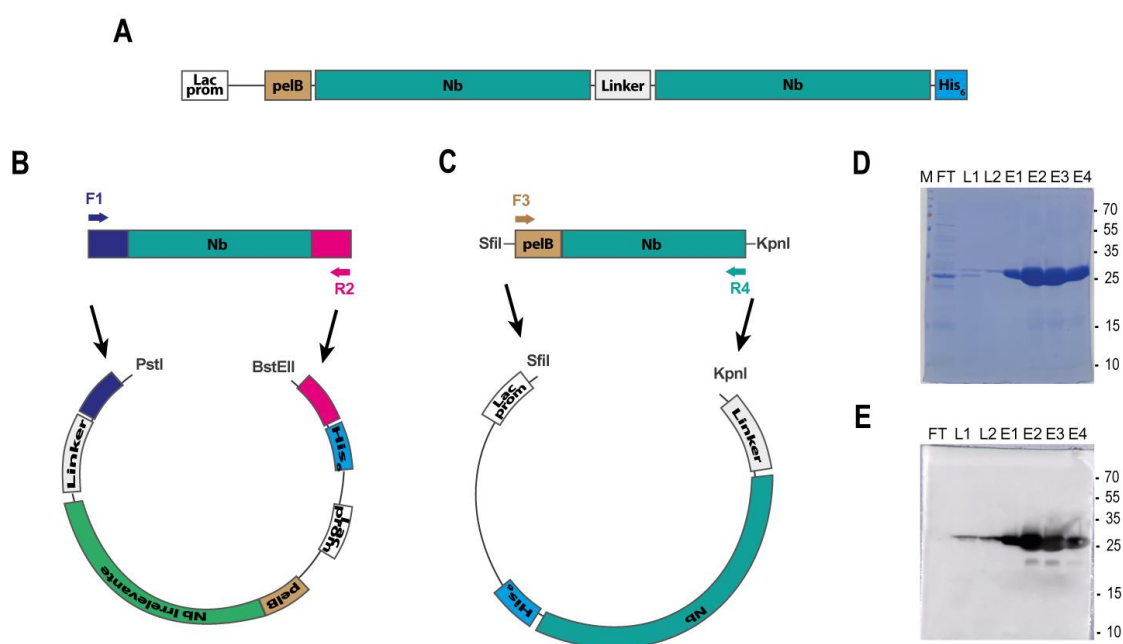


Figura 44. Subclonado, expresión y purificación de los Nbs bivalentes. (A) Diagrama esquemático de la construcción generada para la expresión y purificación de los Nbs bivalentes. (B) Estrategia de clonado del segundo Nb de la molécula bivalente mediante *Infusion Cloning*. (C) Estrategia de clonado del primer Nb de la molécula bivalente mediante digestión con enzimas de restricción y ligación del vector y productos de PCR. (D) Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de un Nb bivalente purificado representativo. (E) Análisis mediante SDS-PAGE y

Western blot de un Nb bivalente purificado representativo. FT: fracción no unida a la resina. L1 y L2: lavados. E1, E2, E3 y E4: eluciones. M: marcador de PM en kDa.

4.3.3. Subclonado, expresión y purificación de Nbs acoplados a la región Fc de las inmunoglobulinas de ratón

Las secuencias de los Nbs se subclonaron en el vector de expresión eucariota pFUSEss, el cual contiene una secuencia señal de secreción al sobrenadante (IL-2), y la inmunoglobulina de tipo G y subclase 2a de ratón, compuesta por la región bisagra (*Hinge*) y los dominios CH2 y CH3 (**Figura 45A**). Para ello, se cortaron los insertos de Nbs y el vector con enzimas de restricción y se ligaron (**Figura 45B**). Estas construcciones se transfectaron transitoriamente en células HEK-293T y, 72 hs después, los Nbs Fc se purificaron desde el sobrenadante de las células mediante una resina de agarosa conteniendo proteína A. Todas las fracciones correspondientes a la purificación de estas moléculas se analizaron por SDS-PAGE, observándose en las calles de las eluciones una banda de aproximadamente 40 kDa, correspondiente a una cadena del anticuerpo (**Figura 45C y D**).

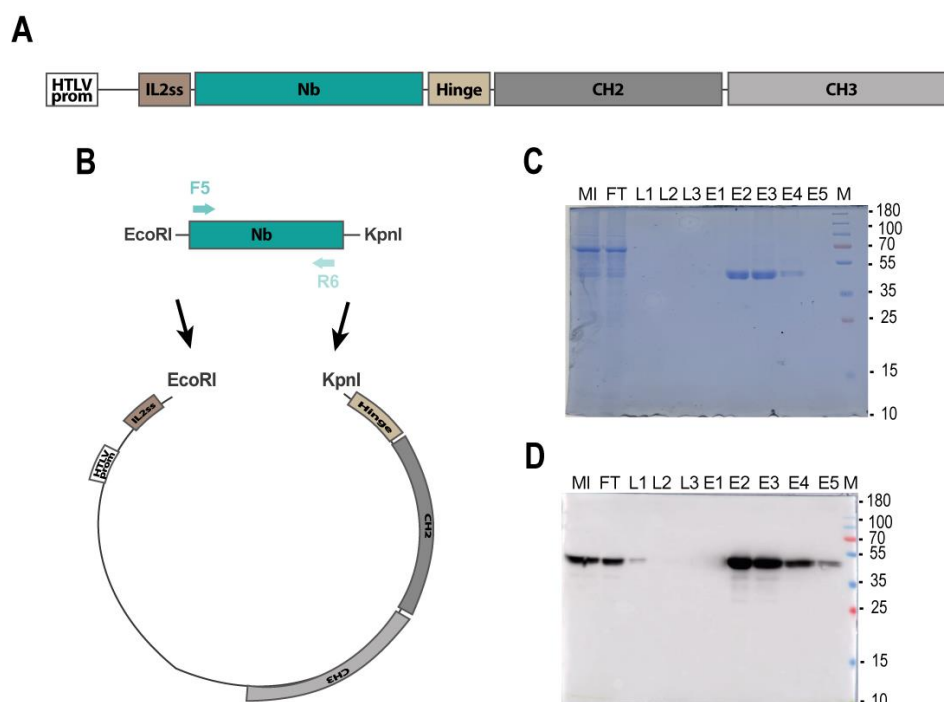


Figura 45. Subclonado, expresión y purificación de los Nbs acoplados a la región Fc de las inmunoglobulinas de ratón. (A) Diagrama esquemático de la construcción generada para la expresión y purificación de los Nbs Fc. (B) Estrategia de clonado de los Nbs mediante digestión con enzimas de restricción y ligación del vector y productos de PCR. (C) Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de un Nb Fc purificado representativo. (D) Análisis mediante SDS-PAGE y Western blot de un Nb Fc purificado representativo. MI: muestra inicial

obtenida del sobrenadante de células transfectadas. FT: fracción no unida a la resina. L1, L2 y L3: lavados. E1, E2, E3, E4 y E5: eluciones. M: marcador de PM en kDa.

4.4. Modificación de los Nbs para mejorar su capacidad como anticuerpos de detección

Los Nbs también se modificaron para mejorar las características de estos como anticuerpos de detección. Una de las modificaciones consistió en la biotinylation de los Nbs a través de dos métodos diferentes: por la acción de la enzima BirA que reconoce una secuencia específica de biotinylation (Avitag) o por transpeptidación mediada por sortasa A (**Figura 46A**) [44], [73], [402], [403]. De esta manera, el Nb biotinylado unido a la NS1 puede ser detectado con estreptavidina conjugada a HRP.

Además, se fusionaron genéticamente las secuencias de los Nbs con la región bisagra, la región Fc de la IgG1 de ratón y la HRP (**Figura 46B**). Esta modificación, denominada Nb Fc HRP, permite la detección directa del complejo anticuerpo de captura-antígeno-anticuerpo mediante la actividad enzimática de la HRP y también mejora la avidéz de los Nbs.

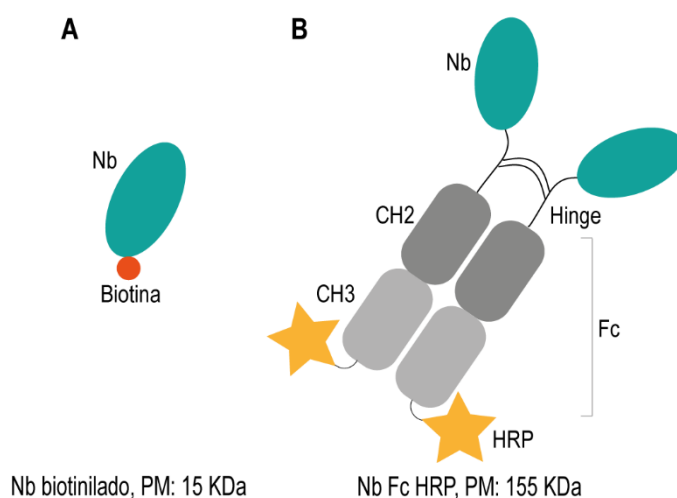


Figura 46. Esquema de los Nbs modificados para la detección de la NS1 de DENV. (A) Nbs biotinylados. (B) Nbs acoplados a la región Fc de ratón y HRP.

4.4.1. Sublonado, expresión y purificación de Nbs biotinylados

En primer lugar, las secuencias nucleotídicas de los Nbs se clonaron en un vector de expresión procariota que contiene dos ORFs: uno para el Nb fusionado a la secuencia AviTag y una etiqueta de 6xHis, el cual se expresa en periplasma por el direccionamiento de la secuencia pelB; y otro para la expresión citoplasmática de la enzima BirA (**Figura 47A**). Para generar esta construcción, las secuencias de los Nbs anti-NS1 se amplificaron

mediante PCR utilizando *primers* que hibridan en regiones conservadas en los Nbs y que agregan una región de 15 pb homóloga a la secuencia del vector (**Figura 47B**). Estos extremos del producto de PCR permitieron la recombinación homóloga con las regiones correspondientes del vector linealizado mediante la técnica de *Infusion Cloning*.

Luego de la expresión de ambos componentes (Nb y BirA), las bacterias se lisaron para liberar el contenido periplásmico y citoplasmático y, en presencia de biotina, la enzima BirA catalizó la unión covalente de una molécula de biotina a un residuo de lisina dentro de la secuencia AviTag del Nb. La expresión y biotinilación de los Nbs se analizó mediante SDS-PAGE y *Western blot*, observándose una correcta expresión de los Nbs (**Figura 47C**). Sin embargo, el revelado de la membrana con streptavidina HRP indicó que la eficiencia de la biotinilación de los Nbs era baja, ya que no se observó la misma intensidad de bandas que la membrana revelada con anti-6xHis HRP (**Figura 47D**).

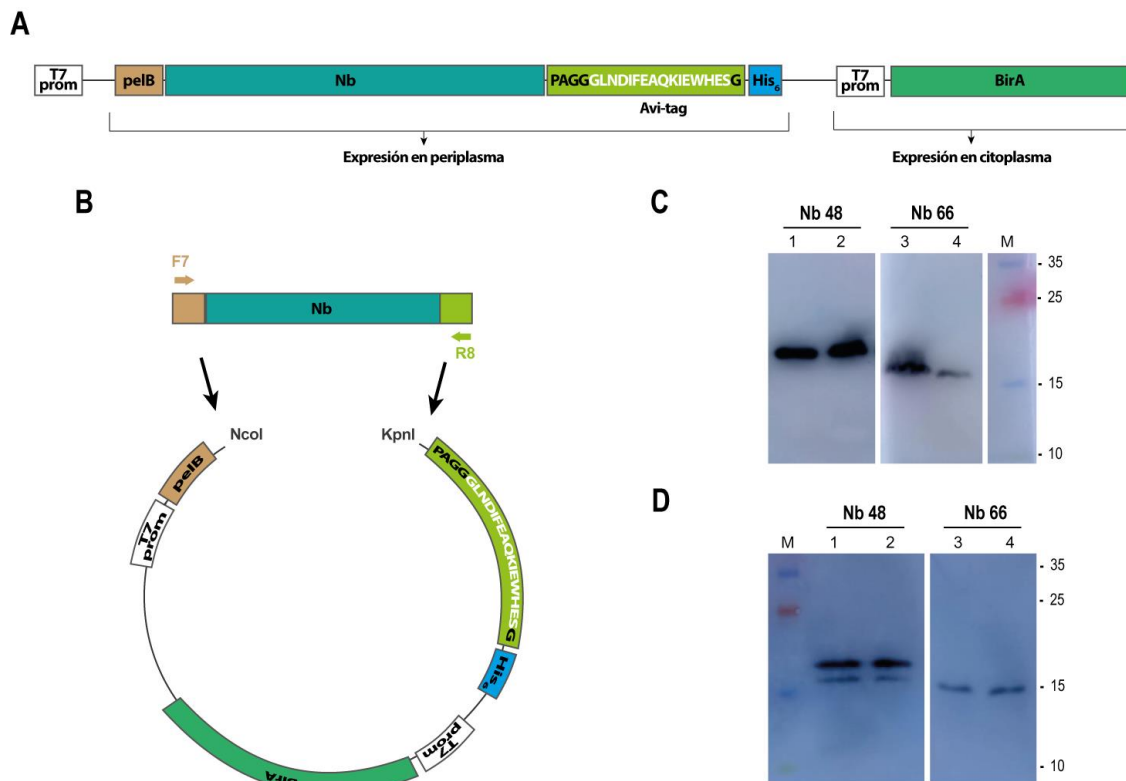


Figura 47. Subclonado, expresión y purificación de los Nbs biotinilados por acción de la enzima BirA. (A) Diagrama esquemático de la construcción generada para la expresión y purificación de los Nbs biotinilados por BirA. (B) Estrategia de clonado de los Nbs mediante *Infusion Cloning*. (C) Análisis mediante SDS-PAGE y *Western blot* de la expresión y purificación de los Nbs 48 y 66. Las proteínas presentes en la membrana se revelaron con un anticuerpo anti-6xHis HRP. (D) Análisis mediante SDS-PAGE y *Western blot* de biotinilación de los Nb-48 y Nb-66. Las proteínas presentes en la membrana se revelaron con streptavidina HRP. Calles 1 y 2: dos clones diferentes del Nb-48. Calles 3 y 4: dos clones diferentes del Nb-66. M: marcador de PM en kDa.

Para mejorar la funcionalización de los Nbs y su capacidad de biotinylación, se generó una nueva construcción que permitió la biotinylación de los Nbs mediada por sortasa A [73]. Las secuencias nucleotídicas de los Nbs se clonaron en un vector de expresión procariota que contiene una secuencia señal pelB para la expresión en el periplasma y una secuencia LPETG (motivo de reconocimiento de la sortasa) y una etiqueta 6xHis en el extremo C-terminal (**Figura 48A**). Para ello, se amplificaron las secuencias de los Nbs, se cortaron los productos de PCR y el vector con enzimas de restricción y se ligaron (**Figura 48B**).

La biotinylación de los Nbs se llevó a cabo mediante una reacción de transpeptidación catalizada por la sortasa A. Esta enzima reconoce el motivo LPETG, cliva la secuencia después del residuo de treonina, formando un intermediario acil-sortasa tioéster y eliminando la etiqueta de histidinas. Luego, este intermediario es resuelto por la adición de un nucleófilo, PEG-biotina, generando un Nb biotinylado en su extremo C-terminal (**Figura 48C**). Después de la reacción, la sortasa A y el Nb sin reaccionar se eliminaron utilizando una resina de níquel, ya que ambos conservan la etiqueta 6xHis. La fracción no unida a la resina contenía los Nbs biotinylados (sin etiqueta de histidinas) y el nucleófilo PEG-biotina en exceso. Este último se eliminó mediante columnas de desalinización PD10. Todos estos pasos de purificación se evaluaron mediante SDS-PAGE y posterior tinción con azul de *Commasie* (**Figura 48D y E**).

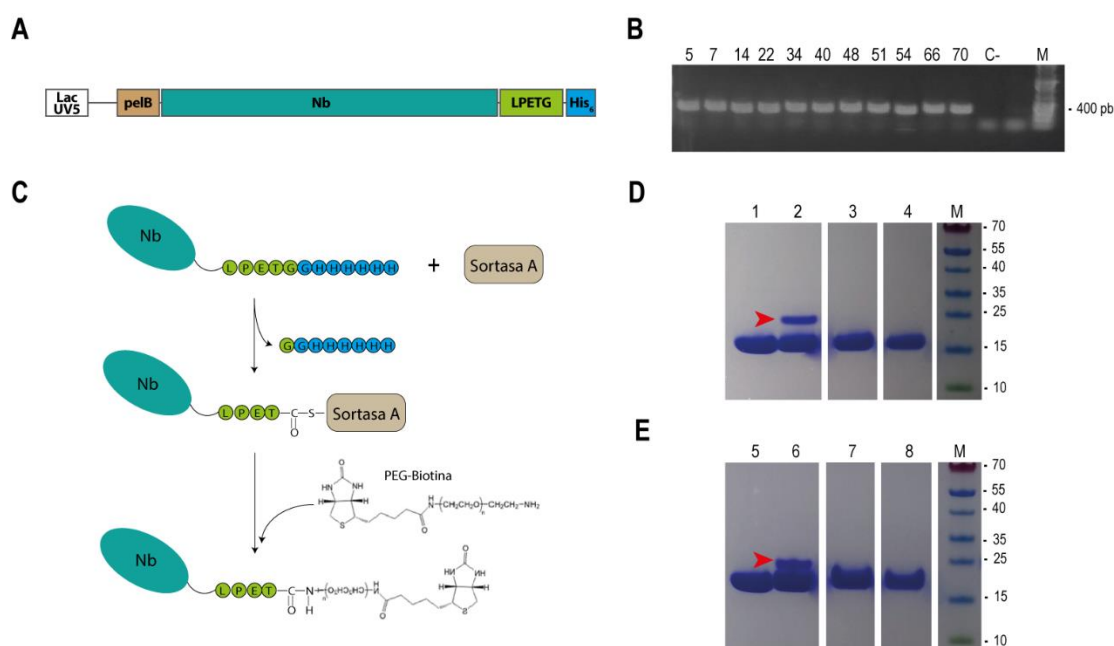


Figura 48. Subclonado, expresión y purificación de los Nbs biotinylados por la transpeptidación mediada por sortasa A. (A) Diagrama esquemático de la construcción generada para la expresión y purificación de los Nbs sortasa. (B) Amplificación del ADN correspondiente a las secuencias de

los Nbs a partir del vector pHEN6. M: marcador de PM de ADN en pares de bases. (C) Esquema de la funcionalización y biotinilación de Nbs mediada por sortasa A y la transpeptidación de PEG-biotina. Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de *Coomassie* de las diferentes etapas de la generación de los Nbs biotinilados, 48 (D) y 66 (E). Calles 1 y 5: Nbs purificados. Calles 2 y 6: reacción de transpeptidación mediada por sortasa A (flecha roja), la banda de 15 kDa contiene Nb biotinilado y sin biotinilar que no se puede diferenciar por tamaño molecular. Calles 3 y 7: fracción de los componentes de la reacción no unida a la resina de níquel, se observa una única banda correspondiente a los Nbs biotinilados que perdieron la etiqueta de histidinas en la reacción con sortasa A. Calles 4 y 8: eluidos luego de la corrida de la muestra por una columna de desalinización PD10 para eliminar el imidazol y el PEG-biotina que no reaccionó. Se observa una única banda correspondiente a los Nbs biotinilados.

Por último, se comparó la eficiencia en la biotinilación de los Nbs por ambos métodos mediante SDS-PAGE y revelado de la membrana con anti-6xHis HRP o estreptavidina HRP. En el revelado con anti-6xHis HRP, se observó una banda de aproximadamente 15 kDa para los Nb-48 y Nb-66 biotinilados por el sistema AviTag, consistente con el PM esperado para los Nbs (**Figura 49, imagen izquierda**). Sin embargo, los Nbs biotinilados por el sistema de sortasa no presentan bandas en esta imagen, ya que este método elimina la etiqueta 6xHis durante la reacción con sortasa A. El revelado con estreptavidina HRP demostró que la eficiencia de biotinilación por el sistema de sortasa A es mayor que por el sistema AviTag, ya que para el primer caso se observan dos bandas intensas de aproximadamente 15 kDa, indicando la presencia de Nbs biotinilados (**Figura 49, imagen derecha**).

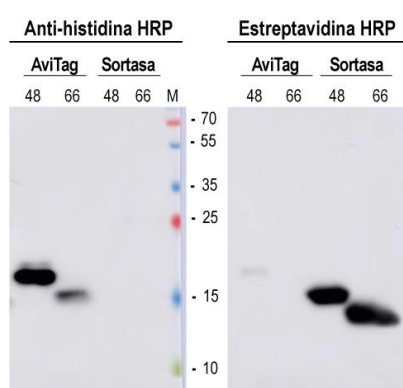


Figura 49. Comparación de la biotinilación de Nbs utilizando dos sistemas diferentes: AviTag y transpeptidación mediada por sortasa A. Imágenes obtenidas a partir de *Western blot* revelado con anti-6xHis HRP (izquierda) y estreptavidina HRP (derecha). M: marcador de PM en kDa. En cada calle se sembraron 800 ng de Nb purificado y biotinilado para comparar los niveles de expresión y biotinilación correctamente.

4.4.2. Subclonado, expresión y purificación de Nbs acoplados a la región Fc de las inmunoglobulinas de ratón y HRP

Las secuencias de los Nbs se subclonaron en un vector de expresión eucariota pFUSE-ss-HRP, que surge a partir del vector pFUSEss que se utilizó para generar los Nbs Fc, pero al que se le incorporó en el mismo marco de lectura la secuencia codificante de HRP, luego de remover el codón *stop* (**Figura 50A**). Para ello, se cortaron los insertos de Nbs y el vector con enzimas de restricción y se ligaron (**Figura 50B**). Estas construcciones se transfectaron transitoriamente en células HEK-293T y, 72 hs después, los Nbs Fc se purificaron desde el sobrenadante de las células mediante IMAC. La integridad y pureza de estas moléculas se analizaron por SDS-PAGE y tinción con azul de *Commassie*, observándose una banda de aproximadamente 80 kDa, correspondiente a una sola cadena del anticuerpo acoplado a HRP (**Figura 50C**).

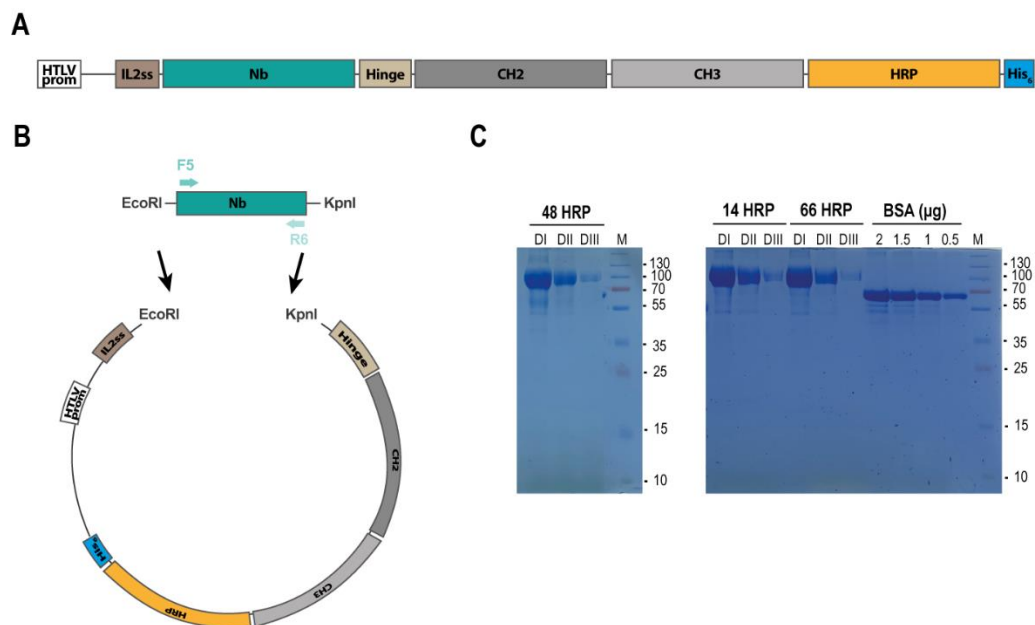


Figura 50. Subclonado, expresión y purificación de los Nbs acoplados a la región Fc de las inmunoglobulinas de ratón y HRP. (A) Diagrama esquemático de la construcción generada para la expresión y purificación de los Nbs Fc HRP. (B) Estrategia de clonado de los Nbs mediante digestión con enzimas de restricción y ligación del vector y productos de PCR. (C) Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de *Commassie* de los anticuerpos purificados. DI, DII y DIII: diluciones de los anticuerpos. M: marcador de PM en kDa.

Los 3 Nbs HRP con mejores rendimientos (Nb-14, Nb-48 y Nb-66), que pertenecen a diferentes grupos filogenéticos, se utilizaron para estudiar la capacidad de unión a la proteína NS1 de los 4 serotipos de DENV sensibilizada en placas de ELISA. En general, los 3 Nbs mostraron una fuerte capacidad de unión a las cuatro variantes de NS1 a concentraciones mayores a 1 nM, sugiriendo su potencial utilidad como anticuerpos de detección en ensayos diagnósticos (**Figura 51**).

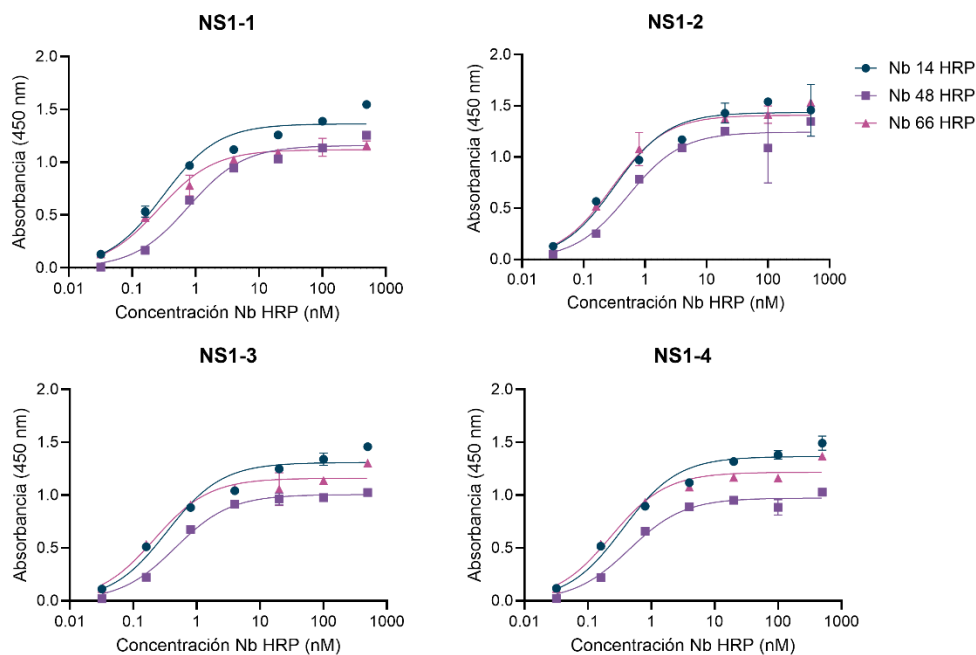


Figura 51. Evaluación de la capacidad de unión de los Nbs a la NS1 de los 4 serotipos de DENV mediante ELISA. Las curvas de absorbancia a 450 nm muestran el perfil de unión obtenido al utilizar concentraciones seriadas de cada Nb HRP.

4.5. Desarrollo de un ELISA sándwich basado en Nbs para detectar la proteína NS1 de dengue

4.5.1. Determinación de las condiciones óptimas de la captura de NS1 recombinante

En primer lugar, se optimizó la captura de NS1-2 recombinante (P) comparando diferentes agentes bloqueantes (3% BSA, 1% BSA, suero equino o 3% leche) y dos marcas de microplacas (Greiner Microlon o Jet-Biofil). También se utilizó una proteína no relacionada (N) como control negativo de la captura, con el fin de calcular la relación entre las absorbancias de las muestras positivas y el control negativo (P/N).

Para ambas placas utilizadas, se observó que al usar una solución de 1% BSA como agente bloqueante se obtuvo el mayor valor de absorbancia a 450 nm, siendo ligeramente superior en las placas Greiner (**Figura 52A**). El uso de una solución de 3% BSA también demostró una buena capacidad de bloqueo, aunque inferior a la concentración anterior. En contraste, el suero equino presentó la menor absorbancia y la leche al 3% mostró una absorbancia intermedia para ambas placas testeadas.

Para evaluar la eficacia de captura, se calculó la relación entre las absorbancias de las muestras positivas y el control negativo (P/N) (**Figura 52B**). El uso de una solución de

1% BSA no solo mostró la mayor absorbancia, sino también la mayor relación P/N, especialmente en las placas Greiner. En comparación, el bloqueo con una solución de 3% BSA y una solución de 3% leche mostraron relaciones P/N más moderadas. El suero equino mostró una relación P/N significativamente menor, lo que indica una menor especificidad en la captura de NS1 recombinante.

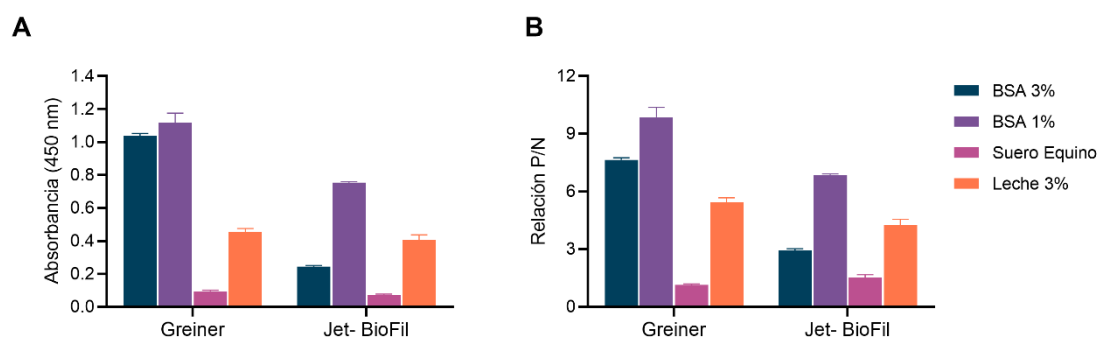


Figura 52. Determinación de las condiciones óptimas para la captura de NS1 utilizando diferentes agentes bloqueantes y dos microplacas de ELISA distintas. (A) Valores de absorbancia para las muestras positivas (captura NS1-2) para cada placa utilizada y agente bloqueante. (B) Relación P/N de la captura de NS1-2 según el tipo de placa y agente bloqueante.

A partir de estos resultados se seleccionó el uso de 1% BSA como el agente bloqueante más efectivo para la captura de NS1 recombinante y la microplaca Greiner ya que mostró un valor de relación P/N mayor que las microplacas de la otra marca.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de captura, se analizó la capacidad de 9 Nbs de capturar la NS1-2 con el fin de seleccionar el/los Nb/s de captura del ensayo diagnóstico. Para ello, se utilizaron dos concentraciones diferentes de Nb de captura y la captura de la proteína recombinante se detectó con un anticuerpo anti-FLAG.

El Nb-14 mostró la mayor capacidad de captura, con un valor de absorbancia cercano a 1 en ambas concentraciones utilizadas. El Nb-48 también fue capaz de capturar la NS1-2, aunque en menor medida ya que los valores de absorbancia obtenidos son menores que con el Nb anterior. Estos resultados sugieren que ambos Nbs podrían ser candidatos prometedores para el uso como anticuerpo de captura en ensayos diagnósticos (**Figura 53**). En contraste, los Nbs 5, 7, 22, 34, 51, 66 y 70 demostraron una baja capacidad de captura de la proteína recombinante.

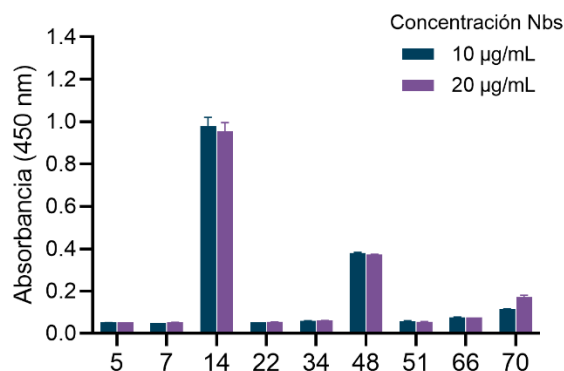


Figura 53. Estudio de la capacidad de captura de la NS1-2 por los Nbs, utilizados en dos concentraciones distintas.

4.5.2. Comparación de la capacidad de captura de NS1 recombinante de las diferentes moléculas generadas

En base a los resultados obtenidos anteriormente, se seleccionó el Nb-14 para ser utilizado como Nb de captura en una prueba de concepto. Los resultados iniciales indicaron que, aunque el Nb-14 tenía una buena capacidad de captura, la cantidad de Nb utilizada para este fin era excesiva, lo que podría no ser práctico para aplicaciones a gran escala. Para abordar este problema, se generaron diferentes construcciones del Nb-14 con el objetivo de aumentar su eficiencia de captura y reducir la cantidad necesaria de Nb.

Como se indicó anteriormente, las modificaciones incluyeron el agregado de una secuencia de pegado a plástico (Nb PSW) para mejorar la inmovilización del Nb en las microplacas, la generación de un Nb bivalente para aumentar la avidéz a la NS1, y la adición del dominio Fc (Nb Fc), que puede proporcionar ambas ventajas previamente descritas. Una vez generadas, expresadas y purificadas estas moléculas, se comparó su capacidad de captura de la NS1-2 a diferentes concentraciones de anticuerpo de captura (**Figura 54A**).

Los resultados indican que el Nb acoplado al dominio Fc (Nb Fc) mostró la mayor capacidad de captura, con un mayor valor de absorbancia a bajas concentraciones de anticuerpo de captura y el menor valor de EC_{50} , lo que confirma su elevada afinidad y avidéz por la NS1 (**Figura 54A y B, Tabla 14**). El Nb bivalente también demostró una capacidad de captura significativamente mayor en comparación con el Nb original y el Nb PSW, presentando un valor de EC_{50} más bajo y una curva de titulación que indica una mayor absorbancia en concentraciones más bajas esta molécula (**Figura 54B, Tabla**

14). Esto sugiere que la bivalencia incrementa la avidez del Nb, mejorando su eficacia de captura.

En contraste, tanto el Nb original como el Nb PSW presentaron curvas de titulación y valores de EC₅₀ similares, indicando que la adición de la secuencia de pegado a plástico no proporcionó una mejora significativa en la capacidad de captura en comparación con el Nb original (Tabla 14).

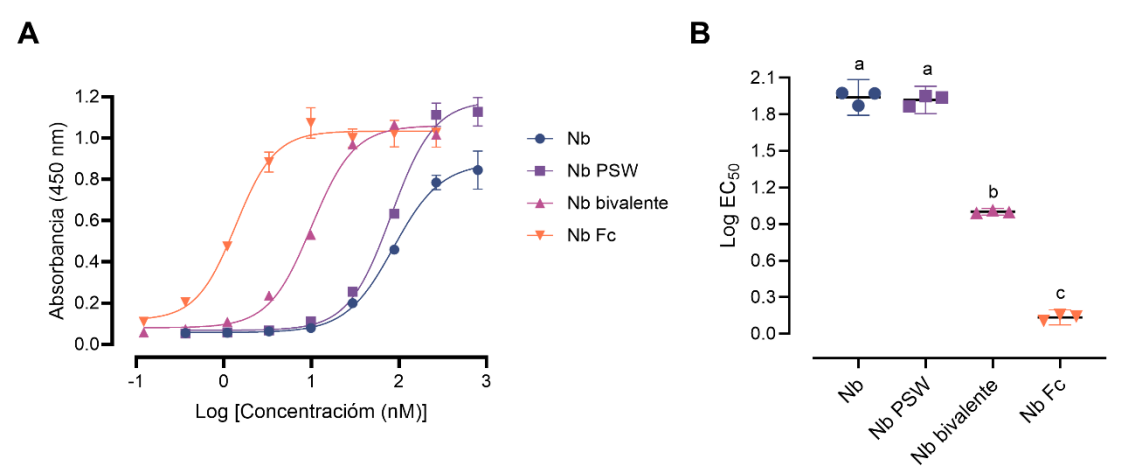


Figura 54. Comparación de la capacidad de captura de NS1 de las diferentes moléculas generadas. (A) Curvas de titulación de los diferentes Nbs modificados (Nb sin modificaciones, Nb PSW, Nb bivalente y Nb Fc) indicando la absorbancia a 450 nm en función de la concentración de los Nbs. (B) Análisis del log EC₅₀ para cada formato de Nb, indicando diferencias significativas en la capacidad de captura. Las letras (a, b, c) indican grupos con diferencias significativas (ANOVA de un factor, comparación múltiple de Tukey, p < 0.01).

Tabla 14. Valores de EC₅₀ de las diferentes moléculas generadas.

Formato	EC ₅₀ (nM)
Nb	86,66
Nb-PSW	81,59
Nb bivalente	10,03
Nb Fc	1,36

Estos resultados destacan que las modificaciones del Nb 14, particularmente la generación de un Nb bivalente y la adición del dominio Fc, pueden mejorar significativamente la capacidad de captura de NS1 recombinante. La mayor capacidad de captura observada para el Nb Fc y el Nb bivalente sugiere que estas modificaciones no solo mejoran la inmovilización del Nb en las microplacas, sino que también incrementan la avidez y la afinidad relativa por la NS1, lo que es crucial para el desarrollo de ensayos diagnósticos más eficaces.

4.5.3. Optimización del ensayo mediante titulación en tablero de ajedrez o diluciones en serie en 2 dimensiones

A partir de los resultados anteriores, se estableció el Nb-14 Fc como anticuerpo de captura y se optimizó el ELISA sándwich mediante diluciones en serie en dos dimensiones, con el objetivo de optimizar dos variables al mismo tiempo: la concentración de uso del anticuerpo de captura y del anticuerpo detector. Como anticuerpos de detección se utilizaron los Nb-48 y Nb-66, seleccionados como representantes de dos de las familias de Nbs agrupadas según el análisis filogenético y de línea germinal de la figura 5. Se consideró la posibilidad de que estos Nbs tuvieran la capacidad de reconocer diferentes epítopes de la proteína NS1. Estos Nbs representativos fueron modificados por acoplamiento a Fc HRP y biotinilación.

Los resultados de la optimización para los Nbs HRP demostraron, en ambos casos, que, a menor concentración de anticuerpo de captura, mayor el valor de absorbancia a 450 nm (**Figura 55A y C**). Esto indica que una concentración más baja de Nb-14 Fc permite una mejor disponibilidad del anticuerpo de captura para la interacción con la NS1 y una menor saturación de la superficie de la placa de ELISA, resultando en una señal de detección más fuerte.

Para el par Nb-14 Fc – Nb-48 HRP, la mayor relación P/N, que surge del valor de absorbancia de la muestra positiva (NS1-2) y negativa (sin NS1-2), se obtuvo utilizando 50 nM del anticuerpo de captura y 10 del anticuerpo detector (**Figura 55B**). En tanto, los resultados obtenidos para el par Nb-14 Fc – Nb-66 HRP indicaron que la combinación de 50 nM de anticuerpo de captura y 20 µg/ml del anticuerpo detector proporcionan una señal óptima para la detección de la NS1-2, con una relación P/N cercana a 6 (**Figura 55D**). En base a los resultados obtenidos, y teniendo en cuenta los costos que implicaría el desarrollo de un ensayo diagnóstico con estas moléculas, se propuso el siguiente sistema (**sistema 1**) para la detección de NS1: **50 nM de Nb-14 Fc como anticuerpo de captura, 10 µg/ml de Nb-48 HRP como anticuerpo detector y 1% BSA como agente bloqueante.**

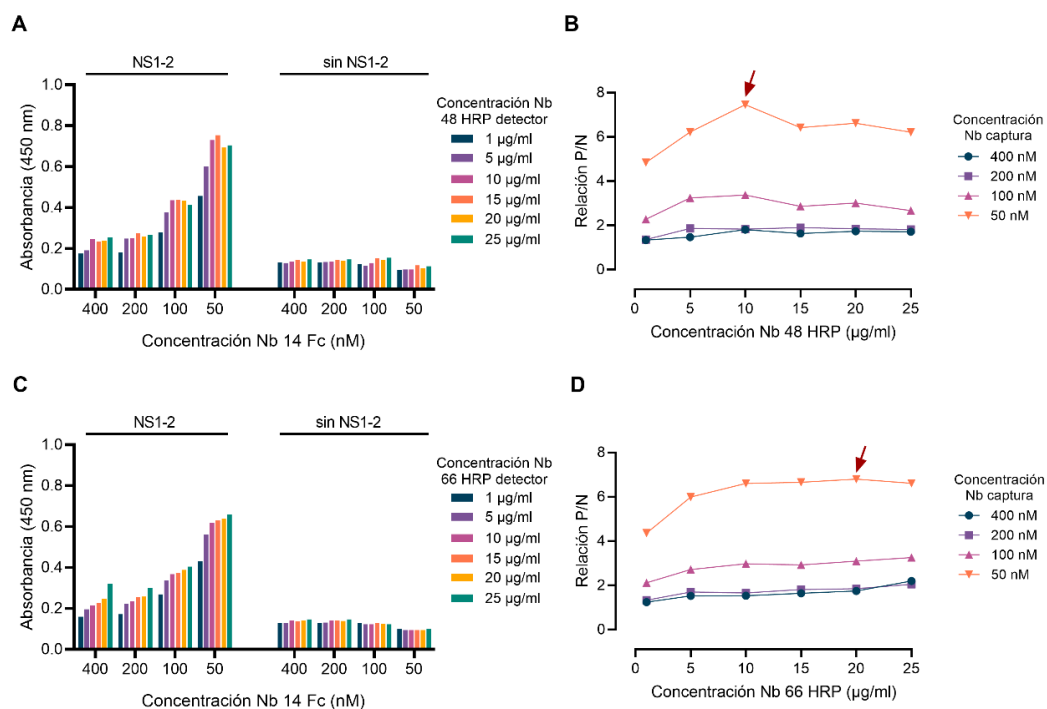


Figura 55. Optimización ELISA sándwich. (A) Valores de absorbancia a 450 nm obtenidos de la titulación en dos dimensiones utilizando el Nb-14 Fc como anticuerpo de captura y el Nb-48 HRP como anticuerpo de detección, utilizando diferentes concentraciones de ambos. El ensayo se realizó tanto con 0,5 µg/ml de NS1-2 como sin NS1-2. (B) Relación P/N para las combinaciones de concentraciones de Nb-14 Fc y Nb-48 HRP, indicando la mejor combinación para la mayor relación P/N. (C) Valores de absorbancia a 450 nm obtenidos de la titulación en dos dimensiones utilizando el Nb-14 Fc como anticuerpo de captura y el Nb-66 HRP como anticuerpos de detección utilizando diferentes concentraciones de ambos. (D) Relación P/N para las combinaciones de concentraciones de Nb-14 Fc y Nb-66 HRP, indicando la mejor combinación para la mayor relación P/N. La relación P/N se calcula dividiendo la absorbancia de las muestras positivas (NS1-2) por la absorbancia de las muestras negativas (sin NS1-2).

Los resultados de la optimización utilizando Nbs biotinilados como anticuerpos de detección mostraron la misma tendencia que se observó previamente con el uso del Nb 14 Fc como anticuerpo de captura. De hecho, se obtuvieron valores de absorbancia mayores al utilizar una concentración aún más baja de Nb-14 Fc (25 nM) (**Figura 56A y C**).

La relación P/N también mostró una mejora significativa en estos ensayos. En el caso del par Nb-14 Fc – Nb-48 biotinilado, la mayor relación P/N se alcanzó al utilizar 25 nM del anticuerpo de captura y 10 µg/ml del anticuerpo detector, con un valor cercano a 12 (**Figura 56B**). En cuanto al par Nb-14 Fc – Nb-66 biotinilado, la relación óptima se obtuvo al combinar 25 nM del anticuerpo de captura y 5 del anticuerpo detector, con un valor P/N de aproximadamente 20 (**Figura 56D**). Estos resultados también demuestran que el

uso de Nbs biotinilados amplifica la señal, aumentando la sensibilidad del ELISA sándwich para la detección de la NS1. Por lo tanto, se propuso como **sistema 2** para la detección de NS1: **25 nM de Nb-14 Fc como anticuerpo de captura**, **5 µg/ml de Nb 66-biotinilado como anticuerpo detector** y **1% BSA como agente bloqueante**.

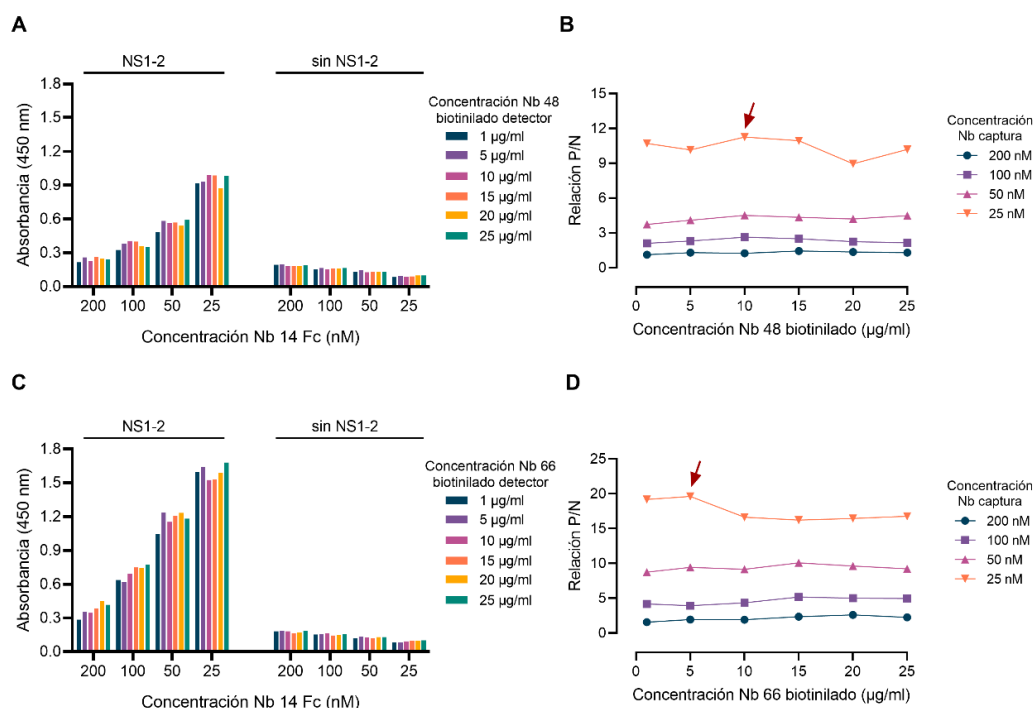


Figura 56. Optimización ELISA sándwich. (A) Valores de absorbancia a 450 nm obtenidos de la titulación en dos dimensiones utilizando el Nb-14 Fc como anticuerpo de captura y el Nb-48 biotinilado como anticuerpo de detección, utilizando diferentes concentraciones de ambos. El ensayo se realizó tanto con 0,5 µg/ml de NS1-2 como sin NS1-2. (B) Relación P/N para las combinaciones de concentraciones de Nb-14 Fc y Nb-48 biotinilado, indicando la mejor combinación para la mayor relación P/N. (C) Valores de absorbancia a 450 nm obtenidos de la titulación en dos dimensiones utilizando el Nb-14 Fc como anticuerpo de captura y el Nb-66 biotinilado como anticuerpos de detección utilizando diferentes concentraciones de ambos. (D) Relación P/N para las combinaciones de concentraciones de Nb-14 Fc y Nb-66 biotinilado, indicando la mejor combinación para la mayor relación P/N. La relación P/N se calcula dividiendo la absorbancia de las muestras positivas (NS1-2) por la absorbancia de las muestras negativas (sin NS1-2).

4.5.4. Estudio de la capacidad de detección de las proteínas NS1 recombinantes y sueros positivos y negativos en los dos sistemas propuestos

La puesta a punto de ambos sistemas desarrollados se llevó a cabo utilizando únicamente la proteína recombinante NS1-2. Esta elección se fundamentó en la practicidad de trabajar inicialmente con un único antígeno, evitando la introducción de

variables adicionales durante la optimización del ensayo. Además, todos los Nbs seleccionados mostraban una alta afinidad para este blanco. Una vez establecidas las mejores condiciones para la detección de NS1 de DENV, se estudió si los dos sistemas desarrollados eran capaces de detectar la misma cantidad de proteína recombinante NS1-1, NS1-3, NS1-4 y NS1 de ZIKV en una matriz de suero que no presenta reactividad frente a NS1 de DENV. La concentración utilizada para este ensayo fue de 0,5 µg/ml, correspondiente a un valor intermedio dentro del rango de concentración reportado para NS1 en suero de pacientes infectados con DENV. Asimismo, se exploró la capacidad de detección de un *pool* de sueros positivos y negativos para DENV, con el objetivo de evaluar la aplicación clínica de los dos sistemas.

Los resultados mostraron que ambos sistemas fueron capaces de detectar las proteínas recombinantes de los serotipos 1, 2, 3 y 4 de DENV, con valores de absorbancia variables (**Figura 57**). En particular, se observó que los sistemas presentaban una alta sensibilidad para la detección de NS1-1 y NS1-2, mientras que la detección de NS1-3 y NS1-4 fue menos eficiente. Asimismo, no se detectó reactividad cruzada con la NS1 de ZIKV, lo que confirma la especificidad de ambos sistemas para distinguir infecciones causadas por DENV de aquellas provocadas por ZIKV. Sin embargo, ninguno de los sistemas logró detectar la NS1 presente en el *pool* de sueros positivos.

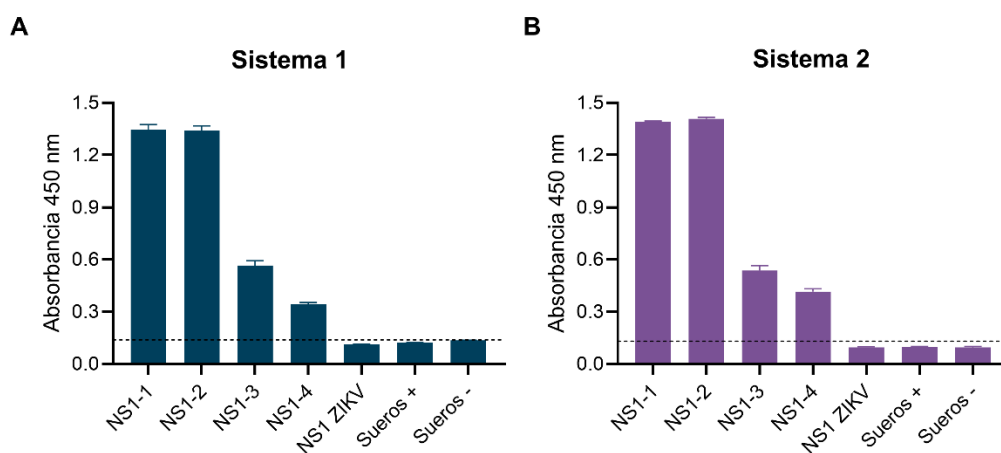


Figura 57. Detección de proteínas recombinantes NS1 de DENV y ZIKV en matriz de suero, y *pool* de sueros positivos y negativos para DENV utilizando los sistemas propuestos. (A) Sistema 1: 50 nM de 14 Fc como anticuerpo de captura y 10 µg/ml de 48 HRP como anticuerpo detector. (B) Sistema 2: 25 nM de 14 Fc como anticuerpo de captura y 5 µg/ml de 66 biotinilado como anticuerpo de detector.

La incapacidad de detectar la proteína NS1 en el *pool* de sueros positivos podría deberse a la formación de complejos inmunes entre la proteína NS1 y anticuerpos anti-NS1

presentes en las muestras. Como ya se mencionó anteriormente, estos complejos podrían enmascarar los epítopes de la NS1, impidiendo su reconocimiento por los Nbs empleados en los sistemas de detección [394], [395].

Para abordar esta limitación, se implementaron diversos tratamientos dirigidos a facilitar la disociación de los complejos inmunes. Entre ellos, se probaron tratamientos térmicos y modificaciones de pH, estrategias conocidas por su capacidad para desestabilizar interacciones antígeno-anticuerpo [404], [405], [406]. Los tratamientos térmicos consistieron en la incubación de las muestras a diferentes temperaturas durante tiempos controlados, mientras que los cambios de pH se realizaron mediante la adición de buffers ácidos o alcalinos para alterar las condiciones del medio. A pesar de estos esfuerzos, los resultados no evidenciaron una mejora en la detección de NS1 en las muestras tratadas.

4.6. Desarrollo de un ELISA sándwich combinado para detectar la proteína NS1 de dengue

4.6.1. Inmunización de un conejo para la generación de un suero policlonal anti-NS1 de DENV

Para la generación de un suero policlonal anti-NS1 de DENV, se inmunizó un conejo siguiendo un protocolo de inmunización de cinco inoculaciones administradas en intervalos específicos (**Figura 58A**). Estos experimentos se realizaron en colaboración con investigadores de la Universidad Nacional de Quilmes. Las primeras dos inmunizaciones incluyeron 200 µg de plásmido pCAGGS NS1-1, NS1-3 y NS1-4. La tercera inoculación consistió en un refuerzo con 30 µg de proteína recombinante NS1-1, NS1-3 y NS1-4, mientras que en las últimas dos inmunizaciones se utilizó únicamente 200 µg de plásmido pCAGGS NS1-1.

A los 207 PID, se extrajo sangre del conejo para la obtención de suero, que posteriormente fue purificado para aislar las inmunoglobulinas de tipo G (IgG) producidas por el conejo inmunizado. La concentración de las IgG purificadas fue de 2,5 mg/ml. La capacidad de estos anticuerpos para reconocer las proteínas NS1 de los 4 serotipos de DENV y ZIKV fue evaluada mediante un ELISA indirecto, en donde la microplaca se sensibilizó con 2 µg/ml de proteína recombinante. Los resultados mostraron que las IgG purificadas poseen una alta capacidad de unión a las proteínas

NS1 de los 4 serotipos de DENV, con valores de absorbancia que aumentan de manera dosis-dependiente (**Figura 58B**). Al realizar una titulación a punto final, se determinó que la concentración mínima de las IgG purificadas para detectar NS1 de los 4 serotipos de DENV fue de 0,195 µg/ml.

Por otro lado, se observó una ligera reactividad cruzada a la NS1 de ZIKV, lo cual es esperable ya que el suero policlonal contiene una mezcla heterogénea de anticuerpos capaces de reconocer múltiples epítopes (**Figura 58B**). Sin embargo, los valores de absorbancia obtenidos fueron menores en comparación con los de la NS1 de DENV, indicando que la afinidad relativa de las IgG purificadas por la NS1 de ZIKV es considerablemente más baja. Además, esta reactividad cruzada sólo se detectó a altas concentraciones de anticuerpos.

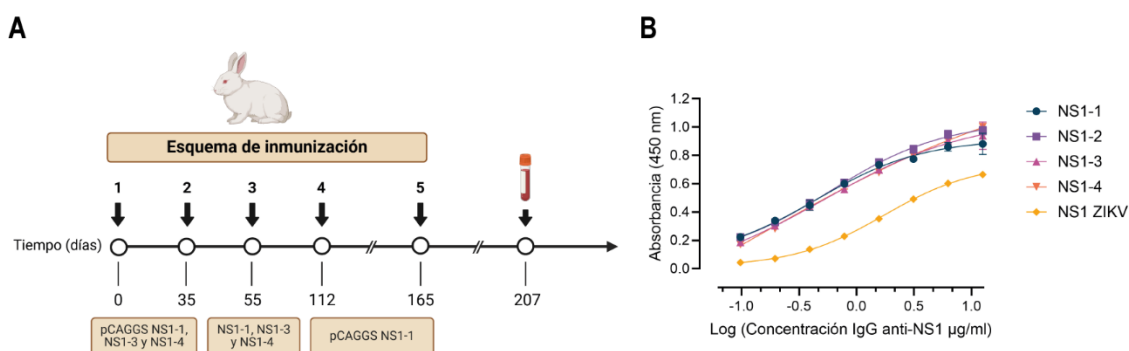


Figura 58. Inmunización y evaluación de la respuesta inmune. (A) Esquema de inmunización: el conejo se inyectó intramuscularmente con 200 µg de plásmido pCAGGS NS1-1, NS1-3 y NS1-4 los días 0 y 35, con 30 µg de proteína recombinante NS1-1, NS1-3 y NS1-4 el día 55 y en los días 112 y 165 con 200 µg de plásmido pCAGGS NS1-1. (B) Curvas de titulación de las IgG purificadas del suero policlonal anti-NS1 frente a las proteínas NS1 de DENV y ZIKV. Se realizaron diluciones seriadas al medio y cada experimento se realizó por duplicado.

4.6.2. Optimización del ensayo diagnóstico y estudio de la capacidad de detección de las proteínas NS1 recombinantes y sueros positivos y negativos

El suero policlonal anti-NS1 de conejo purificado y el Nb-66 biotinilado fueron utilizados para desarrollar un ELISA sándwich combinado para la proteína NS1 de DENV. El Nb 66 biotinilado fue seleccionado como anticuerpo detector debido a su menor costo de producción en comparación con los Nbs HRP, menor concentración de uso y por su buena *performance* en el ELISA basado en Nbs.

En primer lugar, se estudió la capacidad de las IgG purificadas para capturar las proteínas recombinantes NS1 de los 4 serotipos de DENV y ZIKV en una matriz de suero que no presenta reactividad frente a NS1 de DENV (**Figura 59A**). La concentración utilizada para este ensayo fue de 0,5 µg/ml, correspondiente a un valor intermedio dentro del rango de concentración reportado para NS1 en suero de pacientes infectados con DENV. Los resultados mostraron que ambos sistemas fueron capaces de detectar las proteínas recombinantes de los serotipos 1, 2, 3 y 4 de DENV, con valores de absorbancia variables. En particular, se observó que los sistemas presentaban una alta sensibilidad para la detección de NS1-1 y NS1-2, mientras que la detección de NS1-3 y NS1-4 arrojó valores de absorbancia más bajos. A diferencia de lo observado anteriormente en el ELISA indirecto, no se detectó reactividad cruzada con la NS1 de ZIKV cuando las IgG purificadas se utilizaron como anticuerpos de captura, lo que confirma la especificidad del sistema para distinguir infecciones causadas por DENV de aquellas provocadas por ZIKV.

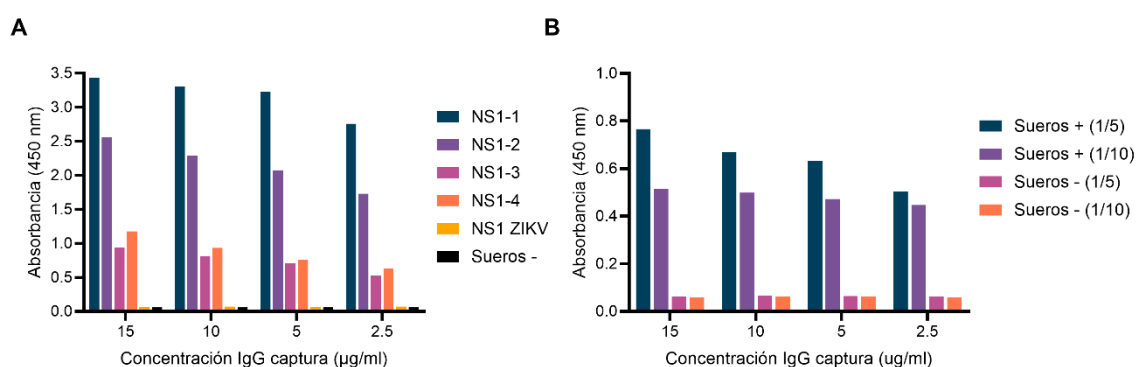


Figura 59. Evaluación del sistema ELISA sándwich combinado para la detección de NS1 de DENV. (A) Detección de proteínas recombinantes NS1 de los serotipos 1, 2, 3 y 4 de DENV, así como NS1 de ZIKV, en una matriz de suero negativo. (B) Detección de NS1 en *pools* de sueros positivos y negativos para DENV diluidos 1/5 y 1/10.

La cantidad óptima de anticuerpos de captura y detección a utilizar en el ensayo, que permita la mejor discriminación entre la señal específica y el *background*, fueron determinadas por medio de una titulación en tablero de ajedrez o diluciones en serie de doble entrada como se describió anteriormente. A partir de estos resultados se determinó utilizar 10 µg/ml de suero policlonal anti-NS1 purificado y 5 µg/ml de Nb-66 biotinilado (resultados no mostrados).

A diferencia de los sistemas basados exclusivamente en Nbs desarrollados previamente, este ELISA sándwich logró detectar la presencia de NS1 en un *pool* de sueros positivos (**Figura 59B**). En ambas diluciones evaluadas (al quinto y al décimo), se obtuvo una señal

claramente diferenciada para los sueros positivos en comparación con los negativos, dando indicios de la robustez y sensibilidad del sistema. Esta capacidad para detectar NS1 en muestras clínicas resalta el potencial del ELISA sándwich combinado como herramienta diagnóstica en escenarios clínicos, superando las limitaciones observadas anteriormente.

4.6.3. Validación del ELISA sándwich combinado

Con el objetivo de validar el uso del ELISA sándwich alternativo se llevaron a cabo estudios para determinar los valores de desempeño del mismo. Estos parámetros fueron determinados a partir del análisis de sueros derivados de individuos con síntomas compatibles con DENV y resultado NS1 positivo (n=101) o NS1 negativo (n=70).

La curva ROC (del inglés, *receiver operating characteristic*) obtenida a partir del ensayo desarrollado presentó un valor de área bajo la curva (AUC, del inglés *area under the curve*) de 0,9818 con un intervalo de confianza del 95% (IC_{95%}) de 0,967 a 0,996, lo cual indica que el inmunoensayo desarrollado en este trabajo posee una buena capacidad discriminativa (AUC > 0,9) (**Figura 60A**).

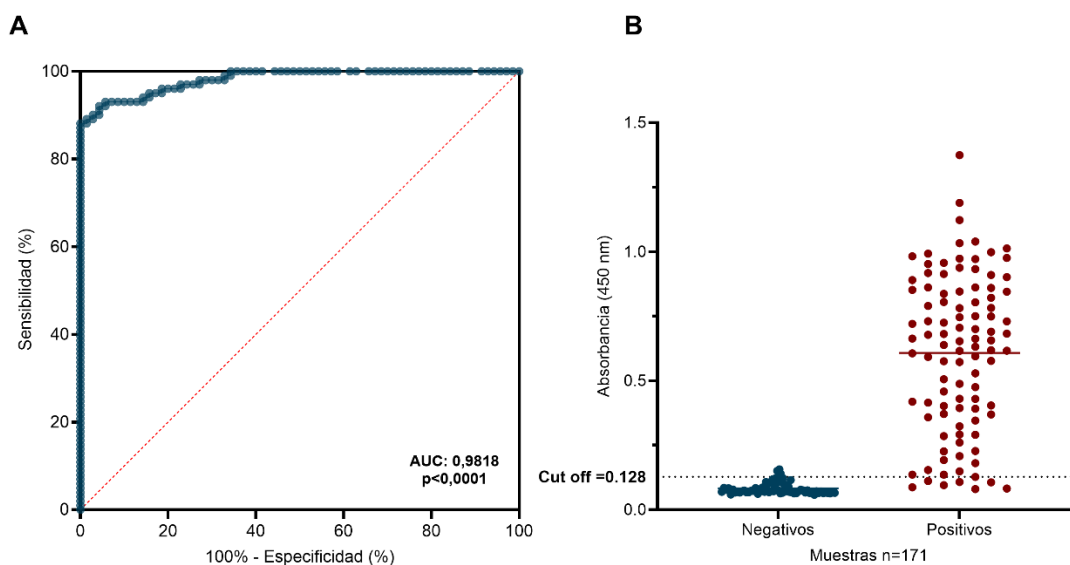


Figura 60. Determinación de los valores de desempeño del ELISA sándwich combinado desarrollado. (A) Análisis ROC de los resultados del ELISA sándwich combinado, se indica el AUC calculada para la validación de este ensayo. (B) Diagrama de puntos interactivo que muestra el valor de absorbancia de cada muestra de suero cuando se determinó el punto de corte.

A partir del índice de Youden y también del método “MaxSpSe”, se estableció como valor de corte una absorbancia 450 nm de 0,128, obteniéndose una sensibilidad diagnóstica de 93,1% (IC_{95%}: 86,2 – 97,2%) y una especificidad diagnóstica de 94,4% (IC_{95%}: 86,5 – 98,5%). De esta manera, las muestras con un valor de absorbancia menor a

0,128 fueron consideradas negativas, mientras que las muestras con un valor mayor a este punto de corte fueron clasificadas como positivas (**Figura 60B**).

4.6.4. Evaluación de la sensibilidad analítica del ELISA sándwich combinado

La sensibilidad analítica del ELISA sándwich combinado fue evaluada utilizando un *pool* de sueros positivos, diluidos al medio (**Figura 61A**). Se obtuvieron valores de absorbancia por encima del punto de corte hasta una dilución 1/256 del *pool* de sueros positivos, lo que confirma la alta sensibilidad del sistema. En contraste, los sueros negativos utilizados como control no mostraron valores de absorbancia por encima del punto de corte propuesto en ninguna de las diluciones evaluadas.

A partir de este ensayo, se determinó el rango lineal del ELISA, delimitado por las diluciones del *pool* de sueros en las que la absorbancia es proporcional a la concentración del antígeno. En este intervalo, se obtuvo una relación lineal significativa, con un coeficiente de determinación (R^2) de 0,997, indicando una excelente correlación entre las diluciones del *pool* de sueros y la señal detectada (**Figura 61B**). Estos resultados demuestran la robustez del sistema desarrollado, ya que el mismo es capaz de mantener una alta sensibilidad y reproducibilidad en un amplio rango de diluciones del *pool* de sueros positivos.

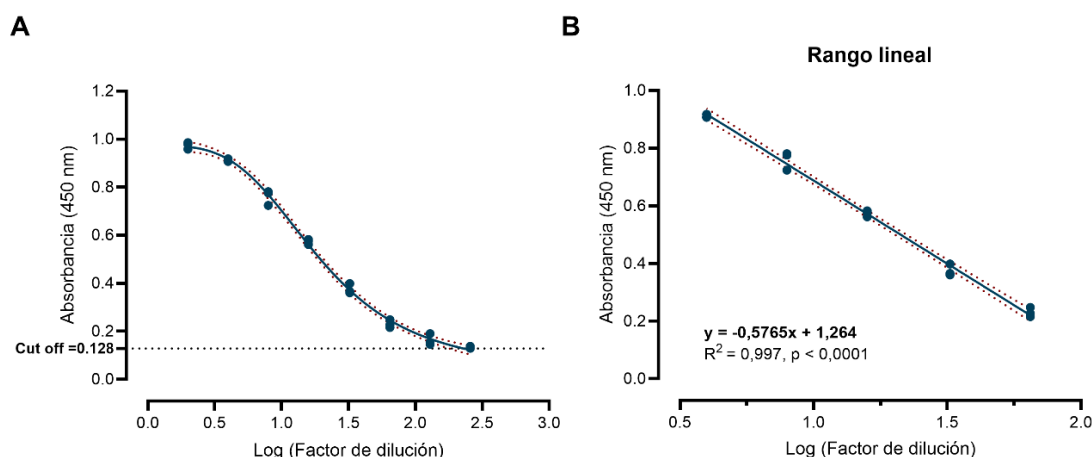


Figura 61. Estimación de la sensibilidad analítica del ELISA sándwich combinado. (A) Valores de absorbancia obtenidos en función de las diluciones seriadas en base 2 del *pool* de sueros positivos en un rango de 1/2 a 1/256 para evaluar la sensibilidad analítica. (B) Análisis de regresión lineal de los valores de absorbancia proporcionales a la concentración del antígeno.

5. Discusión

En las últimas dos décadas, los casos de dengue han aumentado drásticamente a nivel mundial, convirtiéndose en una de las enfermedades virales con mayor impacto en la

salud pública, especialmente en regiones tropicales y subtropicales [356], [357], [358]. A pesar de los múltiples esfuerzos, aun no existe un tratamiento antiviral específico aprobado ni una vacuna eficaz para la mayoría de la población. En este contexto, la detección temprana de la infección es fundamental para prevenir complicaciones graves como el dengue severo, y para el manejo clínico adecuado de los pacientes [358].

A lo largo de los años, se han desarrollado y mejorado diversos ensayos para la detección de dengue, que abarcan desde la identificación de ácidos nucleicos y antígenos virales hasta la detección de anticuerpos IgM o IgG. Sin embargo, su uso de rutina en países endémicos o en vías de desarrollo sigue siendo limitado debido a la falta de infraestructura adecuada, personal capacitado y los elevados costos asociados [407]. Esta problemática se agrava durante los brotes de dengue, cuando los sistemas de salud colapsan, reduciendo su capacidad para confirmar casos sospechosos debido a la falta de insumos. Por ejemplo, en el brote de 2023/2024 en Argentina, sólo el 25% de los casos sospechosos de dengue fueron confirmados mediante pruebas de laboratorio [365]. Ante esta situación, resulta fundamental desarrollar herramientas diagnósticas innovadoras, producidas localmente, que permitan la detección temprana de la infección y ayuden a aliviar la carga sobre los sistemas de salud.

Un ensayo ideal para el diagnóstico de dengue debería ser accesible, fácil de realizar y capaz de diferenciar entre infecciones con otros flavivirus con alta sensibilidad y especificidad [358]. Lamentablemente, aún no se dispone de una prueba con estas características. Por este motivo, el presente trabajo se centró en la caracterización y modificación de Nbs anti-NS1 de DENV, con el objetivo de desarrollar un sistema de diagnóstico temprano y eficiente, que pueda reemplazar los ensayos importados actualmente utilizados.

Para el desarrollo de un ensayo de ELISA destinado a la detección de NS1 es fundamental contar con proteína recombinante de alta pureza y en cantidades suficientes, que permitan la puesta a punto del ensayo diagnóstico. En este trabajo, la expresión y purificación de la NS1 de DENV codificada en el vector pCAGGS presentó limitaciones en cuanto al rendimiento de producción. Por este motivo, se subclonaron las secuencias codificantes de la NS1 de los 4 serotipos de DENV en el vector pFUSEss. Este vector, que utiliza el promotor HTLV, demostró ser más eficiente, aumentado la expresión en el sobrenadante de células transfectadas y duplicando aproximadamente

el rendimiento de la proteína. La superioridad del promotor HTLV radica en su capacidad para aumentar la transcripción y mejorar la eficiencia de traducción mediante la estabilización del ARNm en las células que expresan la proteína [408]. Los rendimientos de producción de esta proteína fueron similares, o incluso mayores, a los reportados previamente empleando sistemas de expresión en *Pichia pastoris* (1 – 5 mg/l) y en baculovirus (1,6 mg/l) [409], [410], [411].

Sin embargo, el análisis mediante SEC-HPLC reveló que la NS1 recombinante purificada (proveniente de este vector) no presentaba la forma oligomérica esperada. Específicamente, su PM sugería la existencia de una forma intermedia entre un dímero y un hexámero, lo que podría deberse a varios factores. Uno de ellos podría ser la presencia de la etiqueta FLAG en el extremo N-terminal, la cual estaría interfiriendo con la multimerización de la proteína [412]. Si bien el pFUSEs proporciona un alto rendimiento, éste está optimizado para la producción de anticuerpos IgG, la ingeniería de estos y el cambio de isotipo, procesos que requieren condiciones específicas de plegamiento [413]. Estas condiciones podrían no ser ideales para la formación de hexámeros de NS1. La presencia de formas oligoméricas incorrectas podría impactar negativamente en la sensibilidad y especificidad del ELISA, ya que la estructura nativa de NS1 es fundamental para el reconocimiento por los anticuerpos [414].

Para este estudio, se trabajó con 11 Nbs anti-NS1 previamente seleccionados en el laboratorio. El número reducido de Nbs únicos obtenidos puede atribuirse al tamaño de la biblioteca utilizada (1×10^8), en contraste con bibliotecas inmunes de mayor tamaño, como la generada para SARS-CoV-2 en el capítulo anterior, que permitió la selección de 43 Nbs únicos. A pesar de esta limitación, los análisis filogenéticos y de origen germinal revelaron una notable diversidad en las secuencias y características estructurales. Esta diversidad es fundamental, ya que aumenta la probabilidad de encontrar Nbs con alta afinidad y especificidad para diferentes epítopes de la proteína. A su vez, la elevada afinidad de los Nbs seleccionados frente a la proteína NS1 de los cuatro serotipos de DENV, pero no de ZIKV, es especialmente relevante para el desarrollo de un ensayo diagnóstico sensible y específico.

Una de las principales ventajas del uso de Nbs frente a los mAbs es su facilidad de modificación, lo que resulta especialmente relevante para el desarrollo de ensayos diagnósticos. La posibilidad de generar multímeros o fusionar Nbs con otros dominios

funcionales permite mejorar la sensibilidad del ensayo [415]. En este contexto, numerosos ensayos tipo ELISA para enfermedades infecciosas han utilizado formatos modificados de Nbs, como Nbs bivalentes, biotinilados o fusionados al dominio Fc, lo que les permite actuar como anticuerpos de captura con una mayor capacidad de unión. A su vez, los Nbs utilizados como anticuerpos de detección suelen ser conjugados con biotina, HRP o fosfatasa alcalina [416], [417], [418], [419], [420], [421], [422].

En este trabajo se comparó la capacidad de captura de la proteína NS1 utilizando diferentes formatos de Nbs: monoméricos, Nb PSW, bivalente y fusionado al dominio Fc. Los formatos bivalente y Fc se destacaron por su capacidad significativamente mejorada para capturar la NS1 en comparación con los otros formatos. Este incremento en la capacidad de captura puede atribuirse a varios factores. En el caso de los Nbs bivalentes, la multivalencia permite un efecto de avidéz, donde la interacción simultánea de ambas regiones de unión con el antígeno aumenta la estabilidad del complejo Nb-NS1. Por su parte, los Nbs fusionados al dominio Fc no solo mejoran la estabilidad estructural, sino que también potencian la orientación adecuada del Nb en la placa de ELISA, lo que mejora el límite de detección [423]. Estos resultados son consistentes con otros desarrollos que demuestran que la multivalencia incrementan la avidéz y la estabilidad de la interacción Nb-antígeno [122], [415].

Para optimizar el desarrollo del ELISA, se evaluaron algunos de los componentes que intervienen en el mismo, como los agentes bloqueantes y las microplacas utilizadas. Estudios previos han demostrado que características intrínsecas de las microplacas pueden introducir variabilidad en el ensayo [424], [425]. Sin embargo, en este trabajo, no se observaron diferencias significativas al comparar las microplacas de dos marcas distintas.

En cuanto a los agentes bloqueantes, la BSA al 1% mostró ser más efectiva que la leche descremada al 3% para reducir el *background* y mejorar la señal específica. Esto podría explicarse por las diferencias en las propiedades fisicoquímicas de ambos bloqueantes. La BSA, debido a su estructura homogénea y su capacidad para adsorberse de manera uniforme en la superficie de la placa, es eficiente en bloquear sitios no específicos sin interferir con la interacción antígeno-anticuerpo. Por el contrario, la leche descremada contiene una mezcla heterogénea de proteínas, como caseínas y proteínas del suero, que

pueden competir con el antígeno o los anticuerpos por los sitios de unión, generando un mayor ruido de fondo y reduciendo la sensibilidad del ensayo [426].

De los 11 Nbs evaluados en este trabajo, solo dos mostraron una capacidad destacada para capturar la proteína NS1-2 en las condiciones óptimas del ensayo (Nb-14 y Nb-48). La baja capacidad de captura de la NS1 observada en los otros Nbs puede explicarse por la naturaleza de la proteína NS1 en solución. Es probable que ciertos epítopes clave de la NS1 estén parcialmente ocultos o inaccesibles cuando la proteína se encuentra en su forma nativa en solución, a diferencia de la exposición de epítopes que ocurre cuando la proteína se sensibiliza en la microplaca, un proceso que puede alterar su conformación y facilitar la interacción con los anticuerpos. Dado que una de las estrategias de selección de Nbs se llevó a cabo utilizando NS1 sensibilizada en microplacas, es razonable suponer que los Nbs seleccionados reconocen preferentemente epítopes expuestos en esta condición, lo que podría explicar por qué solo dos de ellos son eficaces en la captura de NS1 en su forma soluble. Realizar una estrategia de biopaneado con proteína NS1 proveniente de suero de pacientes infectados, capturado en condiciones nativas, podría ayudar a seleccionar Nbs con mejores propiedades de captura.

Por otro lado, la optimización del ensayo mediante titulación en tablero de ajedrez reveló resultados interesantes respecto a la interacción entre las concentraciones de los componentes del sistema diagnóstico y la señal obtenida. Para el Nb-14 Fc, se observó que concentraciones más bajas del mismo mejoraron la captura de NS1. Este comportamiento podría atribuirse a fenómenos de sobresaturación en la superficie de la microplaca. Es decir, a concentraciones elevadas, la cantidad de moléculas de Nb-14 Fc podría generar efectos estéricos que disminuyan la accesibilidad de los epítopes de NS1, limitando su unión efectiva. Además, la sobresaturación podría inducir interacciones no específicas entre las moléculas del anticuerpo de captura o afectar la orientación durante el sensibilizado de la microplaca.

En cuanto a las diferencias observadas entre los dos sistemas propuestos en relación con la amplificación de la señal del anticuerpo detector, los sistemas que emplearon anticuerpos biotinilados o fusionados a HRP mostraron variaciones significativas en la intensidad de la señal. Esto puede explicarse por diferencias en la eficiencia de las reacciones enzimáticas y en la capacidad de amplificación del sistema detector. Por ejemplo, los anticuerpos biotinilados, en combinación con estreptavidina-HRP, suelen

proporcionar una mayor amplificación debido a la alta afinidad y estabilidad del complejo [427], [428]. En contraste, los sistemas con anticuerpos directamente conjugados a HRP podrían estar limitados por la estequiometría 1:2 entre el anticuerpo y la enzima, lo que podría explicar una señal más tenue.

La optimización del ensayo mediante la titulación en tablero de ajedrez fue fundamental para establecer las mejores condiciones experimentales de los dos sistemas propuestos. Sin embargo, al evaluar la capacidad de detección de un *pool* de sueros positivos para DENV, se observó que ambos sistemas mostraron limitaciones en la detección de NS1. Existen varias hipótesis que podrían explicar esta falta de detección. Una primera posibilidad es que la matriz compleja del suero esté interfiriendo en la unión del antígeno con el anticuerpo de captura [429]. Sin embargo, esta hipótesis fue descartada, ya que la adición de NS1 recombinante a una muestra de suero negativo permitió su correcta detección, lo que sugiere que la matriz del suero por sí sola no impide la interacción entre el anticuerpo de captura y la NS1. Otra hipótesis que fue descartada con los resultados obtenidos es la posible interferencia de anticuerpos anti-NS1 presentes en el suero de los pacientes, los cuales podrían estar bloqueando los epítopes de la proteína NS1 e impidiendo su captura [394], [395]. Sin embargo, se llevaron a cabo diversos procedimientos para desestabilizar estos complejos y, aun así, no se observó una mejora en la detección.

Una tercera hipótesis, ya mencionada anteriormente, apunta a la conformación estructural de la NS1 en solución. Es posible que, en su entorno nativo en suero, la proteína adopte una conformación diferente a la de la proteína recombinante sensibilizada en la microplaca, ocultando los epítopes reconocidos por los Nbs de captura.

Finalmente, la cuarta hipótesis se relaciona con la naturaleza monoclonal de los Nbs utilizados. Los Nbs se unen específicamente a un único epítope, lo que limita su capacidad para reconocer variantes conformacionales o diferentes regiones de la NS1 presentes en las muestras de suero. Esto contrasta con los anticuerpos policlonales, que tienen la capacidad de identificar múltiples epítopes en la misma proteína. La naturaleza policlonal no solo incrementa la probabilidad de unión a la NS1 independientemente de su conformación, sino que también mejora la sensibilidad del ensayo [430].

En este contexto, se inmunizó un conejo para generar un suero policlonal anti-NS1, con el objetivo de desarrollar un ELISA sándwich alternativo para la detección de esta proteína. El esquema de inmunización consistió en la administración de plásmidos de ADN que codifican para las proteínas NS1-1, NS1-3 y NS1-4, permitiendo que las células del conejo expresaran la proteína en su conformación nativa. Además, se aplicó un refuerzo con proteína recombinante, una estrategia apoyada por estudios que confirman que la inmunización con ADN y el refuerzo con proteína mejora las respuestas inmunes humorales y celulares [431], [432], [433].

En este trabajo, el suero policlonal de conejo purificado fue utilizado como anticuerpo de captura, mientras que el Nb-66 biotinilado se empleó como anticuerpo detector. La elección de un anticuerpo policlonal como agente de captura se basa en su capacidad para reconocer múltiples epítopes de la proteína NS1, lo que amplía las oportunidades de captura en comparación con un anticuerpo monoclonal. Numerosos estudios previos han utilizado esta estrategia y han demostrado que la combinación de un anticuerpo policlonal para una captura inicial óptima, seguida de un anticuerpo monoclonal para la detección, mejoran la sensibilidad del ensayo y reducen la posibilidad de falsos negativos [434], [435], [436], [437], [438].

El ELISA sándwich combinado desarrollado en este trabajo detectó específicamente la NS1 de DENV, pero no la de ZIKV. Este ensayo deberá ser utilizado para determinar la capacidad de reconocer la NS1 de otros flavivirus relaciones, como el virus de la encefalitis japonesa o el virus del Nilo Occidental, con el fin de confirmar que el ensayo es específico de DENV.

Los resultados obtenidos de la validación demostraron que el ELISA sándwich alternativo posee valores de sensibilidad y especificidad (93,1% y 94,4%, respectivamente) que superan ampliamente los estándares aceptados para ensayos diagnósticos. Estos valores son comparables, e incluso superiores, a los reportados por ensayos comerciales reconocidos a nivel mundial. Por ejemplo, el Platelia™ Dengue NS1 Ag (Bio-Rad), ampliamente utilizado y basado anticuerpos monoclonales, ha reportado sensibilidades que varían entre el 65 % y el 95 %, dependiendo de la etapa de la infección y el serotipo, con una especificidad cercana al 97,9% [439], [440], [441]. Otro ensayo que también se importa y utiliza en Argentina, el Bioline™ Dengue NS1 Ag ELISA (Abbot), presenta una sensibilidad del 93,3% y especificidad de 98,9% [441]. Estos resultados

posicionan al ELISA desarrollado en este trabajo como una alternativa competitiva frente a las opciones comerciales existentes. Una comparación directa con estos ensayos comerciales, utilizando el mismo panel de sueros positivos y negativos, permitiría evaluar de manera más precisa la concordancia analítica entre ambos sistemas y validar aún más la robustez del ensayo desarrollado.

La discrepancia observada en 12 muestras (8 clasificadas como positivas y 4 como negativas para NS1) al ser evaluadas con el ELISA sándwich combinado desarrollado podría explicarse por diversos factores técnicos y biológicos, los cuales han sido reportados previamente en la literatura. Estudios previos han demostrado que la concentración de NS1 en suero varía considerablemente según el serotipo y la carga viral del paciente [393]. Las muestras discordantes podrían corresponder a casos con concentraciones de NS1 cercanas al límite de detección del ensayo, lo que aumenta la probabilidad de resultados falsos negativos o positivos dependiendo de la sensibilidad del ensayo. A su vez, en infecciones secundarias, la formación de complejos inmunes puede reducir la cantidad de NS1 detectable [394], [395].

La mayoría de los ensayos comerciales disponibles para la detección de antígenos NS1 del dengue están basados en mAbs, los cuales presentan varias ventajas clave. Entre ellas, destacan la reducción del ruido de fondo, la alta reproducibilidad debido a su homogeneidad, y una especificidad elevada, ya que se dirigen exclusivamente a un epítipo seleccionado estratégicamente para minimizar la reactividad cruzada. Sin embargo, los anticuerpos policlonales poseen propiedades distintivas que los hacen especialmente útiles en el desarrollo de ensayos diagnósticos. Su capacidad para reconocer múltiples epítopos proporciona una detección más robusta. Además, su producción es considerablemente más económica y menos técnica, lo que reduce los costos operativos del ensayo. Si bien cada lote de anticuerpos policlonales precisa de una calibración para garantizar la consistencia del ensayo, este procedimiento no incrementa de manera sustancial los costos globales, manteniéndose por debajo de los ensayos que emplean anticuerpos monoclonales [442]. A su vez, la diversidad biológica inherente a los anticuerpos policlonales contribuye a una mayor estabilidad frente a variaciones ambientales, facilitando su almacenamiento y manejo. Esto resulta particularmente relevante en regiones con limitaciones de recursos, donde la implementación de ensayos más complejos o que requieren de cadena de frío puede traer sus limitaciones [430]. El sistema propuesto, que combina anticuerpos policlonales como agentes de captura y

Nbs biotinilados como agentes de detección en el ELISA sándwich desarrollado, ofrece una solución técnicamente sólida y económicamente viable para la detección temprana y específica del dengue. La posibilidad de ser producido localmente podría reducir significativamente los costos y aumentar la disponibilidad en entornos con recursos limitados y/o ante la emergencia de brotes epidémicos.

En conclusión, el desarrollo del ELISA sándwich combinado representa un avance significativo en la detección del dengue, combinando sensibilidad, especificidad y viabilidad económica. La integración de anticuerpos policlonales y Nbs permite superar las limitaciones de los sistemas basados exclusivamente en Nbs, ofreciendo un sistema robusto y adaptable. Futuras investigaciones deberán enfocarse en ampliar la validación clínica del ensayo con el objetivo de determinar la concordancia con *kits* diagnósticos comerciales y la precisión intra-ensayo (reproducibilidad) e inter-ensayo (repetibilidad) del ELISA sándwich combinado desarrollado.

Capítulo 5: Conclusiones Generales

1. Conclusiones generales

Los virus estacionales, emergentes y reemergentes, como IAV, el SARS-CoV-2 y el DENV, representan una amenaza constante y multifacética para la salud pública global. Su capacidad para causar brotes severos y pandemias está asociada con una alta tasa de transmisión, evolución genómica acelerada y diversidad genética que complican la implementación de estrategias efectivas de prevención, diagnóstico y tratamiento.

En este contexto, los Nbs han surgido como herramientas prometedoras para abordar estos desafíos. Su tamaño reducido, alta estabilidad y capacidad para unirse con alta afinidad a epítopes específicos de antígenos virales les otorgan ventajas significativas sobre los anticuerpos convencionales. En particular, a través de este trabajo doctoral hemos demostrado el potencial de los Nbs en el desarrollo de métodos diagnósticos y terapias específicas para cada uno de estos virus:

- IAV: Los Nbs desarrollados contra la HA, aunque no demostraron eficacia como agentes antivirales, destacan por su capacidad para reconocer múltiples subtipos virales. Su aplicación podría facilitar la detección temprana de cepas con potencial pandémico en poblaciones de animales, contribuyendo así a la prevención de la transmisión zoonótica y al control eficaz de brotes.
- SARS-CoV-2: Dos Nbs desarrollados contra la proteína S del virus han demostrado una notable capacidad neutralizante frente a diversas variantes, incluidas las subvariantes de Ómicron. Su capacidad para unirse a epítopes conservados y su eficacia terapéutica destacan su potencial para el desarrollo de tratamientos eficaces. Además, estos Nbs ofrecen una solución adaptable para contrarrestar la rápida evolución del virus y prevenir el escape viral, contribuyendo al manejo integral de la enfermedad.
- DENV: Los Nbs desarrollados contra la proteína NS1 demostraron ser herramientas clave para la detección temprana y específica de la infección por dengue. A través del desarrollo de un ELISA sándwich combinado, se logró una sensibilidad y especificidad comparable, e incluso superior, a los ensayos comerciales existentes. La capacidad de los Nbs para reconocer específicamente los cuatro serotipos de DENV, sin reactividad cruzada con ZIKV, resalta su utilidad diagnóstica en regiones donde la co-circulación de flavivirus complica la identificación precisa de los casos. Esto no solo optimiza el manejo clínico, sino

que también fortalece la vigilancia epidemiológica, permitiendo un control más efectivo de los brotes.

En conjunto, los resultados de esta tesis doctoral destacan el rol clave que juegan los Nbs en el ámbito de la salud pública frente a enfermedades infecciosas estacionales, emergentes y reemergentes. Su versatilidad y eficacia en el diagnóstico y tratamiento de infecciones virales posicionan a estas biomoléculas como una plataforma biotecnológica de vanguardia, con aplicaciones que trascienden a aquellas estudiadas en este trabajo. Desde la vigilancia epidemiológica hasta la implementación de terapias dirigidas, los Nbs tienen el potencial de redefinir la manera en que abordamos las amenazas virales en un mundo interconectado, contribuyendo de manera significativa a la protección de la salud humana, animal y ambiental bajo el paradigma de *One Health*.

Capítulo 6: Materiales y métodos

1. Materiales

1.1. Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas para la generación de *stocks* virales, ensayos de caracterización de Nbs y expresión de proteínas recombinantes se detallan en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Listado de líneas celulares utilizadas en esta tesis.

Nombre	Descripción
MDCK	ATCC® CCL-34™. Derivada de la línea celular de epitelio de riñón canino Madin-Darby.
HEK293T	ATCC® CRL-3216™. Derivada de la línea celular parental de células de riñón de embrión humano (HEK293). Expresa el antígeno T largo del virus símico 40.
VERO	ATCC® CCL-81™. Originada a partir de células epiteliales de riñón de mono verde africano.

1.2. Cepas virales

En la **Tabla 16** se detallan las cepas virales utilizadas para el desarrollo de esta tesis y la información sobre el origen de las mismas.

Tabla 16. Listado de cepas virales utilizadas.

Virus	Cepa	Origen
IAV	H1N1 PAN	A/California/7/2009(H1N1)pdm09
IAV	H3N8 Eq	A/equine/Argentina/E-2345-1/2012(H3N8)
SARS-CoV-2	hCoV-19 WT	Aislamiento del año 2020 en Argentina.
SARS-CoV-2	USA-WA1/2020	Aislamiento del primer caso confirmado de COVID-19 en los Estados Unidos.
DENV1	Hawaii	Cepa de referencia de la Organización Mundial de la Salud.
DENV2	New Guinea C	Aislamiento del año 1944 del suero de un paciente febril.
DENV3	Philippines/H87/1956	Aislamiento del año 1956 en Filipinas.
DENV4	8124	Aislamiento del año 1981 en Puerto Rico.

1.3. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas para la obtención de ADN plasmídico, la amplificación de la biblioteca de Nbs y la expresión de proteínas recombinantes se detallan en la **Tabla 17**.

Tabla 17. Listado de cepas bacterianas utilizadas.

Nombre	Genotipo
DH5 α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169, hsdR17(rK-mK ⁺), λ -
TG1	K-12 glnV44 thi-1 Δ (lac-proAB) Δ (mcrB-hsdSM)5(rK-mK ⁻) F' [traD36 proAB ⁺ lacI ^q lacZ Δ M15]
WK6	F' lacI ^q Δ (lacZ)M15 proA ⁺ B ⁺ traD36I Δ (lac-proB) galE rpsL mutS::Tn10 λ
BL21 (DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B -m _B ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB ⁺] _{K-12} (λ S)
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , λ (DE3), pLysS, Cm ^r

1.4. Reactivos e insumos de laboratorio

A continuación, se detallan los reactivos e insumos de laboratorio utilizados para el desarrollo de esta tesis (**Tabla 18**). Se indica la marca de estos y el número de catálogo.

Tabla 18. Listado de reactivos e insumos de laboratorio.

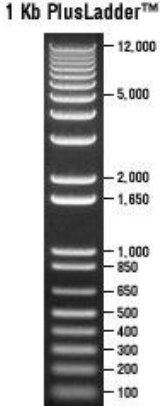
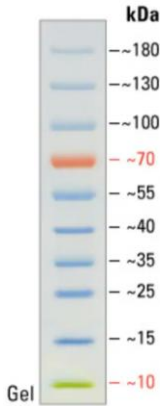
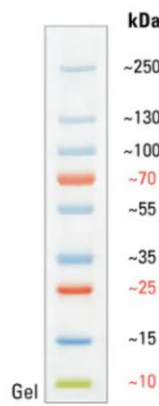
Nombre	Detalle
2-mercaptoetanol	Sigma-Aldrich - N° Catálogo: M6250
2,2'-Azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico]-sal de diamonio (ABTS)	Sigma-Aldrich - N° Catálogo: A1888
Acrilamida/Bisacrilamida	Bio-Rad - N° Catálogo: 161056
Agarosa LE	INBIO HIGHWAY® - N° Catálogo: A0100
Agua libre de nucleasas	Invitrogen™ - N° Catálogo: 750023
Aminoácidos no esenciales (100X)	Gibco™ - N° Catálogo: 11140050
Ampicilina	Sigma-Aldrich - N° Catálogo: A9518
Anticuerpo anti-IgG de ratón HRP	Promega - N° Catálogo: W4021
Anticuerpo anti-IgG de conejo HRP	KPL - N° Catálogo: 074-1506
Anticuerpo monoclonal anti-fago M13 HRP	Abcam - N° Catálogo: ab305291
Anticuerpo monoclonal anti-FLAG HRP	GenScript - N° Catálogo: A01428
Anticuerpo monoclonal anti-VHH HRP	GenScript - N° Catálogo: A01861-200
Anticuerpo policlonal anti-HA <i>tag</i> -HRP	Abcam - N° Catálogo: ab1190
Anticuerpo policlonal anti- <i>His tag</i> -HRP	Abcam - N° Catálogo: ab1187
ARNsa A	Qiagen - N° Catálogo: 19101
BD OptEIA™ TMB	BD Biosciences - N° Catálogo: 555214
Biotina	Sigma-Aldrich - N° Catálogo: 2031
Bromuro de etidio	Sigma-Aldrich - N° Catálogo: E1510
BSA (albúmina de suero bovino)	Thermo Scientific™ - N° Catálogo: B14
Columna de cromatografía Poly-Prep®	Bio-Rad - N° Catálogo: 7311550
DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco)	Gibco™ - N° Catálogo: 12100046

DMSO (dimetilsulfóxido)	Sigma-Aldrich - N° Catálogo: D8418
Estreptavidina-HRP	Thermo Scientific™ - N° Catálogo: 21132
Etanol (grado ACS)	Cicarelli® - N° Catálogo: 752110
Fago auxiliar VCSM13	Stratagene - N° Catálogo: 200251
Glicerina pura	Biopack® - N° Catálogo: 2000166008
Glucosa	Sigma-Aldrich - N° Catálogo: G8270
HEPES	Sigma-Aldrich - N° Catálogo: H3375
HisTrap™ HP	GE Healthcare - N° Catálogo: GE17-524801
IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido)	Sigma-Aldrich - N° Catálogo: I6758
Kit In-Fusion® HD Cloning Plus	Takara - N° Catálogo: 638920
Kit RNAeasy Midi	Qiagen - N° Catálogo: 75144
Kit Spin Midiprep/Maxiprep	Qiagen - N° Catálogo: 12143/12162
Kit Wizard® sv Gel and PCR Clean-Up System	Promega - N° Catálogo: A9281
L-Glutamina (100X)	Gibco™ - N° Catálogo: 25030081
Membrana de nitrocelulosa	Bio-Rad - N° Catálogo: 1620115
PEG 6000 (Polietilenglicol 6000)	Sigma-Aldrich - N° Catálogo: 81260
PEI (polietilenimina)	PolyAR
Penicilina-Estreptomicina (100X)	Gibco™ - N° Catálogo: 15140122
Pierce™ ECL Plus	Thermo Scientific™ - N° Catálogo: 32134
Piruvato de sodio	Sigma-Aldrich - N° Catálogo: P5280
Placa de ELISA Maxisorp	Nunc - N° Catálogo: 446469
Placa de ELISA Microton®600	Greiner Bio-One - N° Catálogo: 655092
Placa de ELISA	JetBiofil - N° Catálogo: FEP200096
Polimerasa de ADN de alta fidelidad Phusion®	Thermo Scientific™ - N° Catálogo: F530L
Polimerasa PFU	PB-L - N° Catálogo: EA0202
QIAamp® Viral RNA Mini Kit	Qiagen - N° Catálogo: 52904
Resina de Ni-NTA agarosa	Qiagen - N° Catálogo: 30210
Resina de proteína G Sepharose™ 4 Fast Flow	GE Healthcare - N° Catálogo: 17-0618-01
Suero fetal bovino (SFB)	Natocor - N° Catálogo: SFBE
SuperScript® III First-Strand Synthesis System	Invitrogen™ - N° Catálogo: 18080051
T4 ADN ligasa	Thermo Scientific™ - N° Catálogo: EL0016 (*)
Taq DNA Polymerase	Invitrogen™ - N° Catálogo: 10342053 (*)
TEMED (N,N,N',N'- tetrametiletilendiamina)	Sigma-Aldrich - N° Catálogo: T22500
Tripsina TPCK	Sigma-Aldrich - N° Catálogo: T1426
Tripsina-EDTA	Gibco™ - N° Catálogo: 25300054

1.5. Marcadores de peso molecular

Los marcadores de PM para ADN y proteínas se indican en la **Tabla 19**.

Tabla 19. Marcadores de PM para ADN y proteínas utilizados.

1 kb plus (Invitrogen) Marcador de ADN	PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)	PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)
		

1.6. Soluciones y medios de cultivo

Las soluciones y medios de cultivo, junto con la composición de los mismo, se especifican en la **Tabla 20**.

Tabla 20. Listado de las soluciones utilizadas en este trabajo.

Nombre	Composición
<i>Buffer</i> bloqueo ELISA 1% BSA	BSA 1% en PBS, Tween-20 0.1% v/v
<i>Buffer</i> bloqueo ELISA 3% Leche	Leche 3% en PBS, Tween-20 0.1% v/v
<i>Buffer</i> bloqueo Western blot	Leche 5% en PBS, Tween-20 0.1% v/v
<i>Buffer</i> de corrida	Tris base 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1% v/v
<i>Buffer</i> de elución para purificación	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8.0, 300 mM NaCl, 300 mM Imidazol
<i>Buffer</i> de elución pH bajo	0,1 M Glicina-HCl (pH 9)
<i>Buffer</i> de elución SEC-HPLC	20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA
<i>Buffer</i> de lavado ELISA	Leche 1.5% en PBS, Tween-20 0.05% v/v
<i>Buffer</i> de lavado para purificación	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol
<i>Buffer</i> de transferencia	48 mM Tris, 39 mM glicina, metanol 20% (pH 9,2)
<i>Buffer</i> de unión a resina para purificación 5x	250 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8.0, 1.5 mM NaCl, 50 mM Imidazol
<i>Buffer</i> TES	Tris 24,22 g/l, EDTA 0,19g/l, sacarosa 171,15 g/l (pH 8)

Medio de cultivo LB (Luria-Bertani)	Tryptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 5 g/L
Medio de cultivo LB-agar	Medio LB, 15 g/l de agar bacteriológico
Medio de cultivo SOB	Tryptona 20 g/l, extracto de levadura 5 g/l, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ y 10 mM MgSO ₄ (pH: 7)
Medio de cultivo TB (Terrific broth)	Tryptona 12 g/l, extracto de levadura 24 g/l, NaCl 5 g/l, 0,231 g/l KH ₂ PO ₄ y 1,25 g/l K ₂ HPO ₄
PBS (<i>Buffer</i> fosfato salino)	NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na ₂ HPO ₄ 8 mM y KH ₂ PO ₄ 2 mM (pH: 7,4)
PBS-T	PBS con Tween-20 0,05% v/v
SDS 10% p/v	SDS 10% p/v
Solución colorante azul de Coomassie	Coomassie R-250 0,1% p/v, metanol 40% v/v y ácido acético 10% v/v
Solución decolorante	Metanol 40% v/v y ácido acético 10% v/v
Solución de PEG/NaCl	PEG 6000 20% p/v, NaCl 2,5 M
Solución de tinción con cristal violeta	Cristal violeta 1% p/v, paraformaldehído 4% v/v y etanol 10% v/v
Solución P1	Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM y ARNasa A 0,1 g/ml (pH: 8)
Solución P2	NaOH 0,1 M y SDS 1% p/v
Solución P3	Acetato de potasio 1,5 M (pH: 5,5)

1.7. Sueros de pacientes

Las muestras de suero utilizadas para la validación del ELISA sándwich anti-NS1 fueron gentilmente cedidas por el Laboratorio de Investigaciones Infectológicas y Biología Molecular del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez. Estas muestras fueron tomadas durante los años 2018 y 2019 por el Hospital San Vicente de Paul, Orán, Salta. El protocolo fue aprobado por la Comisión Provincial de Investigación en Ciencias de la Salud (COPICSA) del Ministerio de Salud de Salta con el número de referencia 321-196940/18. La información de las muestras ha sido publicada previamente [443].

Las muestras de suero positivas para NS1 fueron obtenidas de individuos con síntomas compatibles con dengue, cuyo diagnóstico fue confirmado por detección del antígeno NS1 (n=101). Estas muestras se recolectaron entre el primer y el quinto día desde el inicio de los síntomas, dependiendo del individuo. Por otro lado, las muestras negativas para NS1 corresponden a muestras obtenidas de individuos más de 10 días de evolución de la enfermedad (n=70). Es importante destacar que, en este último grupo, no se realizó la

detección del antígeno NS1 mediante ELISA, ya que no se esperaría la presencia de niveles detectables de NS1 circulante en sangre.

2. Métodos

2.1. Técnicas generales de biología molecular

2.1.1. Cuantificación de ADN

La concentración del ADN purificado (plásmidos y fragmentos de ADN purificados por gel de agarosa) se midió mediante espectrofotometría utilizando Nanodrop. La relación de absorbancias A260/A280 se utilizó para evaluar la pureza del ADN. Un valor de relación en el rango de 1.8 a 2.1 era considerado como muestras lo suficientemente puras.

2.1.2. Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN fue realizada por la empresa MacroGen. Para ello, se enviaron 80-100 ng/μL de ADN plasmídico con los *primers* correspondientes.

2.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa

Para amplificar fragmentos específicos de ADN se realizó una PCR utilizando la enzima PFU ADN polimerasa o la pre-mezcla *CloneAmp™ HiFi*, según especificaciones del fabricante. Se utilizaron las siguientes combinaciones de *primers* para amplificar fragmentos de ADN específicos:

	Par de <i>primers</i>	Secuencia	Aplicación
	CALL01/CALL02	GTCCTGGCTGCTCTTCTACA AGG/GGTACGTGCTGTTGAA CTGTTCC	Amplificación de las regiones variables de los anticuerpos de cadena pesa y convencionales
SARS-CoV-2	VHH-Back-SAPI/VHH-Fw-SAPI	CTTGGCTCTTCTGTGCAGCT GCAGGAGTCTGGRGGAGG/T GATGCTCTTCCGCTGAGGAG ACGGTGACCTGGGT	Amplificación de las secuencias de Nbs
	MP57/ GIII	TTATGCTTCCGGCTCGTATG/ CCACAGACAGCCCTCATAG	<i>Colony</i> PCR en construcción de la biblioteca de Nbs
	Fw_DelR452L/Rv_De IR452L	TAACTACCTCTATAGACTGTT CAGGAAATCCAAC/CTATAG AGGTAGTTATAGTTGCCACC CACC	Generación mutación R452L en proteína S de la variante Delta

DENV	Fw1_NS1_IL2_Flag_ EcoRI/Rv1_NS1_IL2_ Flag	GCACTTGTCACGAATTCGCA GACAAGGATTGCATGG/GTTT TTGTTTCGGGTCCTCCGCTACC CGCTGTCACCATTGAC	Subclonado de secuencias codificantes para la proteína NS1 de los 4 serotipos de DENV en vector pFUSEss
	Fw2_NS1_IL2_Flag/R v2_NS1_IL2_Flag_Bst EI	GACGATGACAAGGCTAGCC AGACAAGGATTGCATGG/GT TTTTGTTTCGGGTCCTCCACCA CTCATGGCTGCAGC	
	Fw_PSW_PstI/Rv_PS _NotI	GCAGCCAGGGGCAACTGCA GGAGTCTGGAGG/TACGGGT ATGCGGCCGCTGAGGAGAC GGTGACCTG	Subclonado Nbs para generar Nbs PSW
	Fw2-inf-biv-PstI/Rv2- inf-biv-BstEII	GCCCAGGTGCAGCTGCAGG AGTCTGGAGGA/TGAGGAGA CGGTGACCTGGGTGCCCTGG CCCCA	Subclonado Nbs en vector Phen6 para generar Nbs bivalentes
	Fw_pelB/Rv1-inf-biv- KpnI	ATGAAATACCTATTGCCTAC GGCAG/TGAGGAGACGGTGA CTTGGGTACCCTGGCCCCA	
	Fw_Nbs_pDuBirA/ Rv_Nbs_pDuBirA	GCCCAGCCGGCCATGGCCC/ CTAACGGTGACCTGGGTACC CTGGCCCCA	Subclonado Nbs en vector pDUBIR para generación de Nbs biotinilados
	Fw_Nbs_sort/ Rv_Nbs_sort	CCATGGCCCAGGTGCAGCTG CAGGAGTCTGGGGGAGGMT TRGTGCAGSCTG/CCGGTTTC CGGCAGTCCTCTGAGGAG ACKGTGACCTGGGT	Subclonado Nbs en vector sortasa para generación de Nbs biotinilados
	Fw_Nbs_IgG_HRP/ Rv_Nbs_IgG_HRP	CTTGCACTTGTCACGAATTC GCAGGTGCAGCTGCAGGAG TCTGG/TGAGGAGACGGTGA CTTGGGTACCCTGGCCCCAG	Subclonado Nbs en vector pFUSEss para generación de Nbs Fc HRP

2.1.4. Electroforesis en gel de agarosa y purificación de ADN

Los fragmentos de ADN se separaron por tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa para la verificación de su tamaño o purificación. Para este propósito, se generaron geles de agarosa al 0.8-1% que contenían bromuro de etidio. Las muestras se prepararon con el volumen adecuado de *buffer* de carga 6x y se sembraron en los pocillos del gel. Los geles se corrieron a 60V durante 45-70 min dependiendo el tamaño del fragmento a observar o purificar. Las bandas de ADN se visualizaron y documentaron con un transiluminador UV.

Para la purificación de las bandas cortadas de los geles, se utilizó el *kit* comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), y el ADN se purificó de acuerdo con el protocolo del fabricante. Finalmente, los fragmentos de ADN se eluyeron con 30-40 µL de *buffer* de elución TE.

2.1.5. Digestión de ADN utilizando enzimas de restricción

La digestión por restricción del ADN se realizó utilizando las endonucleasas de restricción y *buffers* adecuados de *New England Biolabs* (NEB), según el propósito y el sitio de restricción del plásmido. La temperatura y las condiciones del *buffer* para la digestión se eligieron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se utilizaron las siguientes combinaciones de enzimas para la digestión por restricción:

Plásmido digerido	Enzimas	Propósito
pHEN6 Nb 2 bivalente	NcoI + BstEII	Suclonado del Nb 2 anti-HA para generar Nb bivalente
pFUSEss	EcoRI + PvuII	Linearización vector para <i>Infusion cloning</i> de plásmidos de expresión NS1
pMECs anti-EPEA PSW	PstI + NotI	Linearización vector para <i>Infusion cloning</i> de plásmidos de expresión Nbs-PSW
pHEN6 Nb bivalente 2.2 L20 anti-HA	PstI + BstEII	Linearización vector para <i>Infusion cloning</i> del segundo Nb en vector Nbs bivalentes
pHEN6 Nb bivalente 2.X L20 anti-HA	SfiI + KpnI-HF	Digestión vector para clonado del primer Nb en vector Nbs bivalentes
PCR Nb 14 y Nb 48	SfiI + KpnI-HF	Digestión PCR para clonado del primer Nb en vector Nbs bivalentes
pFUSEss Nb 2 anti-HA Fc	EcoRI-HF + KpnI-HF	Digestión vector para clonado de Nbs anti-NS1 fusionados al dominio Fc
PCR Nb 14 y Nb 48	EcoRI-HF + KpnI-HF	Digestión PCR para clonado de Nbs anti-NS1 fusionados al dominio Fc
pDUBIR anti-EPEA avitag	NcoI + KpnI	Linearización vector para <i>Infusion cloning</i> de Nbs anti-NS1 biotinilados por BirA
pHEN6 Nb con sitio de sortasa	PstI + BstEII	Linearización vector para <i>Infusion cloning</i> de Nbs anti-NS1 biotinilados por reacción con sortasa
pFUSEss Nb 2 anti-HA Fc HRP	EcoRI-HF + KpnI-HF	Digestión vector para clonado de Nbs anti-NS1 fusionados al dominio Fc HRP
PCR Nbs anti-NS1	EcoRI-HF + KpnI-HF	Digestión PCR para clonado de Nbs anti-NS1 fusionados al dominio Fc HRP

2.1.6. Ligación de fragmentos de ADN

Las reacciones de ligación se realizaron utilizando T4 ligasa y el *buffer* de ligación de *Thermo Scientific™*. Los fragmentos de ADN de interés y el vector (50-100 ng) se ligaron en una relación molar 3:1 (inserto:vector) en volumen final de 10 µL a 16°C durante toda la noche. A su vez, se realizaron mezclas de ligación sin inserto como control de la reacción.

2.1.7. *In-fusion cloning*

Para realizar los clonados mediante la técnica de *In-fusion cloning*, primero se linealizaron los vectores en los que se deseaba insertar los fragmentos de ADN utilizando una o dos enzimas de restricción adecuadas. Luego de la digestión, se purificaron los mismos.

Por otra parte, se realizó una amplificación por PCR de los fragmentos de ADN de interés utilizando *primers* que contienen extensiones de 15 pb en el extremo 5', complementarias a los extremos de los vectores linealizados. Los productos de PCR se purificaron y, a continuación, se prepararon las reacciones del clonado mediante *In-fusion cloning*. Para ello, se agregó el vector linealizado y el inserto en una relación molar 2:1 (inserto:vector), junto con la enzima *In-fusion HD* en un volumen final de 10 µL a 50°C durante 15 min. Luego de la incubación, se utilizaron 2 µl de la mezcla de reacción para transformar células competentes. Para el control de ligación, se preparó una mezcla conteniendo sólo el vector linealizado.

2.1.8. Preparación de células TG1 electrocompetentes

Dos días antes de la preparación de las células electrocompetentes, se plaquearon células TG1 en una placa de medio mínimo sin antibiótico y se incubó durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se inoculó una colonia de TG1 en un tubo cónico de 50 ml conteniendo 5 ml de medio 2xTY y se incubó con agitación toda la noche a 37°C.

Para la preparación de las células electrocompetentes, se inocularon 2 ml del pre-cultivo de TG1 en un matraz Erlenmeyer de 2 L conteniendo 300 ml de medio 2xTY. El mismo se incubó con agitación a 37°C hasta que la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) alcanzó un valor entre 0.8 y 1.0. Seguido a esto, se colocó el cultivo en hielo durante 1 h. Luego se centrifugó por 7 min a 2200 x g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 300 ml de HEPES 1nM pre-enfriado. A continuación, se centrifugó nuevamente por 6 min a 2200 x g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 150 ml de glicerol al 10% pre-enfriado. La suspensión de células se centrifugó por tercera vez

durante 6 min a 2200 x g a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió suavemente el *pellet* 60 ml de glicerol al 10%.

Finalmente, se centrifugó una última vez durante 5 min a 2200 x g a 4°C. Después de descartar el sobrenadante, se resuspendieron las células en glicerol al 10% hasta un volumen final de 1 ml. Se alicuotaron de a 50 µl de suspensión celular en tubos *ependorf* estériles para congelar a -80°C o usar inmediatamente.

2.1.9. Preparación de células competentes químicas

Para obtener las diferentes *E. coli* competentes necesarias para los ensayos (ver sección 1.3), se inoculó 1 ml del pre-cultivo en 200 ml de medio LB. El mismo se incubó con agitación a 37°C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,4. Luego, se centrifugó el cultivo durante 10 min a 4500 rpm y a 4°C, y se descartó el sobrenadante. Seguido a esto, se resuspendió el *pellet* en 40 ml de MgCl₂ (0.1 M), sin usar vortex, y la mezcla se centrifugó nuevamente durante 10 min a 4500 rpm a 4°C. El *pellet* obtenido se resuspendió en 4 ml de CaCl₂ 0.1 M, y se incubó en hielo durante 1 h. Finalmente, se agregó a la mezcla glicerol a una concentración final de 15% y se separaron alícuotas de 100 µl, que se conservaron a -80°C hasta su utilización.

2.1.10. Transformación de bacterias competentes

Las bacterias químicamente competentes (ver bacterias utilizadas en la sección 1.3) se transformaron mediante *shock* térmico. Para ello, se agregaron cantidades apropiadas de ADN plasmídico o productos de ligación a 50 µl de bacterias competentes y se incubaron en hielo durante 20 min. Luego del shock térmico a 42°C durante 45 seg, las bacterias conteniendo en ADN se colocaron nuevamente en hielo durante 2 min. A continuación, se agregaron 800 µl de medio de cultivo adecuado y se agitaron durante 1 h a 200 rpm y 37°C. Finalmente, se sembró un volumen de bacterias adecuado en placas de Petri conteniendo LB agar con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

2.1.11. Extracción y purificación de ADN plasmídico

Se seleccionaron colonias individuales crecidas en placas de Petri y se cultivaron en 3 ml, 100 ml o 250 ml de medio LB con los antibióticos correspondientes para la mini-preparación, midi-preparación o maxi-preparación de ADN plasmídico, respectivamente.

La mini-preparación de ADN plasmídico se llevó a cabo de manera casera. En primer lugar, se centrifugaron los cultivos durante 10 min a 4500 rpm y se resuspendió el *pellet* de bacterias en 300 µl de solución P1. A continuación, se agregaron 300 µl de solución P2, con el fin de generar la lisis de las bacterias. Transcurridos 5 min, se adicionaron 400 µl de solución P3 para precipitar el ADN genómico. Se incubó en hielo durante 5 min para facilitar el proceso de precipitación de ADN y se centrifugó durante 10 min a 12000 rpm. Se trasvasó el sobrenadante a otro tubo y se agregaron 550 µL de isopropanol, con el fin de precipitar el ADN plasmídico. A continuación, se centrifugó durante 30 min a 12000 rpm y se adicionaron 500 µl de etanol 70 %. La muestra se centrifugó durante 10 min a 12000 rpm, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado para que se evaporara todo el etanol. Por último, se resuspendió el *pellet* en 30-50 µl de agua mQ pH 8.

La purificación de los plásmidos para midi-preparación o maxi-preparación se llevó a cabo según el protocolo de los *kits* Spin Midiprep o Maxiprep (Qiagen).

2.2. Técnicas de bioquímica de proteínas

2.2.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Las proteínas obtenidas se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% o 12%, dependiendo del tamaño de la proteína. Las muestras se prepararon al mezclar un volumen determinado con *buffer* de carga 6X y se desnaturalizaron durante 6 min a 100°C. La electroforesis se realizó durante 20 min a 90 V y luego durante 60 min a 120 V en *buffer* de corrida. Finalizada la corrida electroforética, los geles se desmontaron para colorear con colorante azul de *Coomassie* (Sección 2.2.2) o para transferir a una membrana de nitrocelulosa para ensayos de *Western blot* (Sección 2.2. 3).

2.2.2. Tinción con azul de Coomassie

El gel de poliacrilamida desmontado se coloreó con una solución de azul de *Coomassie* durante 3 hs a temperatura ambiente en agitación suave. Luego se decoloró toda la noche en solución decolorante.

2.2.3. Electrotransferencia y Western blot

La electrotransferencia consiste en transferir las proteínas del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa mediante la aplicación de una corriente eléctrica. Para ello, se cortaron del mismo tamaño que el gel dos papeles de filtro y una membrana de

nitrocelulosa y se incubaron, en recipientes separados, con *buffer* de transferencia durante 1 min. Se montó el aparato de transferencia (Trans-Blot® Semi-Dry Transfer Cell, de BIORAD. EE. UU) con el sándwich, que consta de: filtro-membrana de nitrocelulosa-gel-filtro. La transferencia se realizó durante 30 a 60 min a 20 V, dependiendo del tamaño de las proteínas a transferir.

La membrana de nitrocelulosa se bloqueó con *buffer* de bloqueo a 4°C en agitación durante 1 h. Luego se la incubó con el anticuerpo primario a temperatura ambiente durante 1 h y, transcurrido ese tiempo, se lavó 3 veces con PBS-T, durante 20 min en agitación. En caso de ser necesario, se incubó 1 h con el anticuerpo secundario y nuevamente se lavó la membrana de 3 veces con PBS-T, durante 20 min con agitación. Finalmente se añadió la solución de revelado.

2.2.4. Cuantificación de proteínas por densitometría en gel

La cuantificación de las proteínas recombinantes purificadas fue llevada a cabo por densitometría en gel. Las muestras fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida como se detalló previamente (sección 2.2.1). Luego de la tinción con azul de *Coomassie* y decoloración, el gel fue digitalizado y analizado con el programa informático *GelAnalyzer* 2010a. La concentración de la proteína de interés fue calculada mediante la interpolación del valor de densidad óptica de la banda correspondiente en una curva de calibración generada con diferentes concentraciones de un patrón de seroalbúmina bovina (BSA).

2.2.5. Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC) en sistema AKTA

La cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC) se llevó a cabo utilizando un sistema de purificación AKTA. Para la purificación de Nbs fusionados con una etiqueta de 6xHis, se emplearon columnas de níquel *His-Trap™ HP*, mientras que para la purificación de Nbs fusionados al dominio Fc, se utilizaron columnas de proteína G. Las muestras de proteína fueron previamente filtradas y la columna equilibrada con *buffer* de unión antes de la inyección.

La elución de las proteínas unidas a las columnas de níquel se realizó con un gradiente de imidazol (20–500 mM) en el mismo *buffer* de unión. Para las columnas de proteína G, la elución se llevó a cabo utilizando un *buffer* de pH bajo (0.1 M glicina-HCl, pH 2.7) con posterior neutralización inmediata en fracciones colectadas con 1 M Tris-HCl, pH 9.0.

El proceso de purificación se llevó a cabo a 4°C y con un flujo constante de 1 ml/min. Las fracciones eluidas fueron monitorizadas en tiempo real a 280 nm mediante el sistema AKTA UNICORN™. Las fracciones que contenían la proteína de interés, identificadas por su perfil cromatográfico, fueron recolectadas, concentradas y dializadas en PBS antes de su uso en experimentos posteriores.

2.2.6. Cromatografía de exclusión molecular (SEC-HPLC)

La cromatografía de exclusión molecular por HPLC (SEC-HPLC) se llevó a cabo utilizando una columna *Superose-6* (GE Healthcare), en donde se inyectaron 20-30 µM de proteína recombinante NS1-2 producida a partir de la transfección del plásmido pCAGGs y pFUSEss. La elución de las proteínas se realizó con *buffer* de elución, ajustado a un pH de 7.0. El experimento se realizó a temperatura ambiente (~25 °C) con un flujo de 0,5 ml/min. Se utilizó un equipo HPLC JASCO, equipado con un inyector automático, una bomba cuaternaria y un detector UV-VIS UV-2075, monitorizando la elución a 280 nm.

2.3. Técnicas de biología celular

2.3.1. Cultivo de células eucariotas

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo están listadas en la sección 1.1. Todas las líneas celulares se cultivaron en frascos de cultivo celular T25, T75 o T175 con los medios de cultivo correspondientes y se mantuvieron en una incubadora a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂. Todos los materiales y medios utilizados durante el cultivo celular fueron previamente esterilizados mediante autoclave durante 20 min a 121°C o filtrados estérilmente.

Para el pasaje de células, se añadió una alícuota de suspensión celular diluida en una proporción de 1:10 a 1:20 cada 3-4 días, dependiendo del requerimiento y la condición de las células. La línea celular adherente HEK293-T se cultivó en medio completo DMEM con 10% SFB y piruvato de sodio. Estas células se lavaron primero con PBS, luego se desprendieron con 150 µl (frasco T25), 350 µl (frasco T75) o 1 ml (frasco T175) de tripsina 1x a 37°C. La actividad de la tripsina se detuvo añadiendo medio fresco, y las suspensiones celulares se centrifugaron para eliminar el sobrenadante que contenía tripsina. Los *pellets* celulares se resuspendieron en medio fresco y se sembraron en nuevos frascos de cultivo celular. Para las líneas celulares Vero o Vero E6, se utilizó el

medio completo MEM con 5% SFB y se pasó una alícuota de la suspensión celular a nuevos frascos en una proporción de 1:5 cada 7 días.

Las densidades celulares se determinaron con una cámara de recuento de Neubauer y la confluencia celular se comprobó bajo el microscopio. Los parámetros de centrifugación durante el cultivo celular fueron de 5 min a 1000 rpm a 4°C. Para los frascos de cultivo celular T25, T75 y T175 se utilizaron 5 ml, 10 ml y 15 ml de medio de cultivo celular, respectivamente.

2.3.2. Generación de stocks virales de IAV por infección en células MDCK

La producción de stocks virales de IAV se llevó a cabo mediante infecciones en células MDCK utilizando una dilución inicial 1:100 de la semilla viral, en medio DMEM sin suero y tripsina-TPCK. Para cada virus, se utilizaron 3 botellas conteniendo una monocapa de células MDCK confluentes.

Previo a la infección, las células se lavaron dos veces con PBS para eliminar restos de suero y otros componentes que pudieran interferir con la infección. Posteriormente, las monocapas se inocularon con el volumen necesario de partículas virales en medio de infección sin suero, asegurando la cobertura total de la superficie celular. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5 % de CO₂ durante 2 hs para permitir la adsorción viral. Seguido a esto, se agregó tripsina-TPCK al medio en una concentración final de 2 µg/ml para facilitar la propagación viral. Las células se mantuvieron en las mismas condiciones hasta que se observó un desprendimiento de la monocapa celular, indicador de una infección viral exitosa.

El sobrenadante del cultivo se cosechó y los virus se purificaron mediante ultracentrifugación a 26000 rpm durante 4 hs a 4°C. El *pellet* de partículas virales se resuspendió en PBS-sacarosa 25 %. Finalmente, se prepararon alícuotas de 20 µl que fueron almacenadas a -80°C hasta su utilización.

2.3.3. Transfección transitoria de células eucariotas

Las células HEK293-T se prepararon con un día de anticipación a la transfección y se sembraron en placas de 6 o 96 pocillos o placas redondas de 150 cm², de manera que alcanzaran una confluencia celular del 80-90%. La transfección se realizó utilizando polietilenimina (PEI, PolyAr87) en una relación de ADN y PEI 1:2.5, respectivamente. La cantidad apropiada de ADN plasmídico y PEI se diluyeron en medio OptiMem en tubos

cónicos separados y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se mezclaron bien ambas soluciones en un único tubo y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min para permitir la formación de complejos ADN-PEI. Mientras tanto, se cambió el medio de cultivo de las células a medio fresco DMEM sin SFB. Se agregó la mezcla de transfección a las células de manera uniforme y se incubaron las células a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ durante 48-72 hs para permitir la expresión del ADN transfectado. La cantidad de ADN y el volumen de medio según cada placa de cultivo utilizada se listan en la siguiente tabla.

Placa de cultivo	Cantidad de ADN	Volumen OptiMem en mezcla final
96 pocillos	100 ng/well	0.1 ml
6 pocillos	500 ng/well	0.5 ml
150 cm ²	24 µg/placa	2 ml

Los plásmidos y el propósito particular de cada transfección se detallan en la siguiente tabla.

	Plásmido	Propósito de transfección
IAV	pFUSEss Nb 2 Fc	Caracterización/Ensayos de inhibición
	pFUSEss Nb GFP Fc	Control negativo ensayos de inhibición
	R1AB6	Control positivo ensayos de inhibición
SARS-CoV-2	VRC7473-2019 nCoV S-dFurin-WT-F3CH2S_JSM	Inmunización/Selección/Ensayos de unión y competencia
	pCAGGs nCoV19	Inmunización/Selección/Ensayos de unión y competencia
	pCAGGs nCoV19, residuos 319 a 541	Inmunización/Selección/Ensayos de unión y competencia
	pLB-GFP (Addgene, 11619)	
	VRC5602, backbone lentivirus (NIH) VRC7475_2019-nCoV-S (WT o variantes)	Generación de pseudovirus de SARS-CoV-2
DENV	pCAGGs-MCS NS1-1, NS1-2, NS1-3 y NS1-4	Selección/Ensayos de unión /Puesta a punto ensayo diagnóstico
	pFUSEss-IL2 NS1-1, NS1-2, NS1-3 y NS1-4	Ensayos de unión y competencia /Puesta a punto ensayo diagnóstico
	pFUSEss-IL2 NS1 ZIKV	Control especificidad ensayo diagnóstico
	pFUSEss-IgG2a Nb 14	Anticuerpo de captura/Ensayo de competencia

pFUSEss-IgG2a Nb 48	Ensayo de competencia
pFUSEss-IgG2a Nb 66	Ensayo de competencia
pFUSEss-IgG1 Nb 14 HRP	Ensayo de competencia
pFUSEss-IgG1 Nb 48 HRP	Anticuerpo de detección/Ensayo de competencia
pFUSEss-IgG1 Nb 66 HRP	Anticuerpo de detección/Ensayo de competencia

2.3.4. Producción de pseudovirus

La producción de pseudovirus que expresan la proteína S de SARS-CoV-2 se llevó a cabo mediante la co-transfección de células HEK-293T con 10 µg de un plásmido que contienen un gen reportero GFP (pBL), 5 µg de un plásmido de un *backbone* de lentivirus (VRC5602, NIH) y 3 µg del plásmido que codifica para la proteína *Spike* WT (VRC7475_2019-nCoV-S-WT). Para producir pseudovirus que expresan la proteína S de diferentes variantes, se utilizaron los siguientes plásmidos: Alpha (B.1.1.7) (InvivoGen, plv-spike-v2); Beta (B.1.351) (InvivoGen, plv-spike-v3) y Delta (B.1.617.2) (InvivoGen, plv-spike-v8). Los plásmidos que codifican la proteína S de las variantes Ómicron (B.1.1.529 y BA.2) se obtuvieron del consorcio *G2P-UK National Virology*.

Veinticuatro horas después, se verificó la eficiencia de transfección, indicada por la fluorescencia de GFP, bajo un microscopio fluorescente. Los sobrenadantes de los pseudovirus fueron recolectados 48 hs post-transfección y almacenados a 4°C, agregando medio fresco (DMEM+5% FBS) a las placas. Tras otras 48 hs, los sobrenadantes combinados fueron clarificados por centrifugación durante 10 min a 3000 rpm para eliminar las células residuales. El sobrenadante obtenido se centrifugó durante 5 hs a 10,000 rpm. El *pellet* resultante se resuspendió en medio de almacenamiento (OptiMEM + 6% sacarosa) y las alícuotas se congelaron a -80 °C hasta su uso.

Los títulos de los pseudovirus se determinaron mediante la transducción de células HEK-293T previamente sembradas en placas de 96 pocillos y transfectadas transitoriamente con 100 ng de ACE2 (NIH) y 10 ng de la proteasa TMPRSS2 (NIH) por pocillo. El *stock* de pseudovirus (sobrenadante concentrado) se diluyó en serie en medio de ensayo (DMEM + 2.5% FBS), se incubó durante 2 hs a 37°C y se añadió a las células transfectadas. Los títulos virales se calcularon contando las células GFP positivas utilizando una herramienta automatizada en ImageJ. Para el ensayo se utilizaron títulos de 200–225 células GFP positivas/campo con un aumento de 100×.

2.4. Producción de Nbs

Los métodos descriptos en esta sección corresponden al desarrollo de Nbs contra las proteínas S-2P y RBD del virus SARS-CoV-2. Para la producción de Nbs dirigidos contra la HA del IAV o la NS1 de DENV se utilizaron métodos similares a los detallados a continuación. Sin embargo, estos métodos fueron llevados a cabo por otros estudiantes de doctorado del grupo de investigación.

2.4.1. Inmunización de las llamas

Una llama ubicada en la Unidad Experimental de Camélidos del INTA fue inmunizada por vía intramuscular con 200 µg por dosis de la proteína recombinante SARS-CoV-2 S-2P producida en células HEK-293T los días 0 y 14, y con 200 µg de SARS-CoV-2 S-2P producida en células CHO y 100 µg de la proteína RBD producida en células HEK-293T los días 28 y 50. Se utilizaron dos fuentes diferentes de la proteína S-2P debido al bajo rendimiento obtenido en células adherentes (HEK-293T) y a la urgencia en la disponibilidad de la proteína para las inmunizaciones. Se empleó adyuvante completo de Freund para la inmunización inicial y adyuvante incompleto de Freund para los refuerzos posteriores.

La gestión, inoculación y recolección de muestras de la llama fueron realizadas por personal capacitado bajo la supervisión de un Doctor en Medicina Veterinaria, de acuerdo con las directrices argentinas e internacionales para el bienestar animal. Este estudio fue aprobado por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de INTA (CICUAE) bajo el protocolo N° 15/2020.

2.4.2. Monitoreo de la respuesta inmune

Las respuestas de anticuerpos contra S-2P y RBD se monitorizaron mediante ELISA y pVNT los días 4 y 7 después de cada inoculación (ver sección 2.6.1 y 2.6.4, respectivamente). Para ello, se extrajo una muestra de sangre de la llama, en donde se separó el plasma y suero para hacer los análisis correspondientes.

2.4.3. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica y extracción de ARN total

Las células mononucleares de sangre periférica fueron extraídas a partir de 200 ml de sangre anticoagulada con citrato de sodio, la cual se obtuvo de la vena yugular del animal inmunizado, 4 días después del último refuerzo. La sangre se diluyó en un

volumen igual de NaCl al 0.9%. Posteriormente, se añadieron hasta 30 ml de sangre diluida a cada tubo de Leucosep, previamente cargado con 15 ml de Ficoll. Los tubos se centrifugaron a temperatura ambiente durante 10 min a 1000 x g utilizando un rotor basculante sin frenos. Se retiró el plasma de la capa superior, teniendo cuidado de no alterar la interfase que contenía las células.

Los linfocitos de sangre periférica (PBL) se recogieron de la interfase y se colocaron en dos tubos de centrifuga nuevos. Se añadieron 10 volúmenes de PBS por volumen de PBL a cada tubo, se mezcló bien y se centrifugó a 4°C durante 10 min a 250 x g. El sobrenadante se decantó con cuidado y el *pellet* se resuspendió suavemente en PBS.

Las suspensiones celulares de todos los tubos se recogieron en un único tubo y se lavaron 2 veces más por centrifugación como se mencionó anteriormente. Las células se resuspendieron en PBS y se contaron.

Para la extracción de ARN total, se distribuyó la suspensión celular de manera que se obtuvieran aproximadamente 1×10^7 células por tubo. El ARN total se aisló utilizando el *kit RNAeasy Midi* (Qiagen), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

La concentración de ARN se midió por espectrofotometría UV, considerando que una OD₂₆₀ de 1 corresponde a 40 µg de ARN/ml. El ARN se utilizó inmediatamente para sintetizar el cDNA o se almacenó a -80°C.

Para asegurar la integridad del ARN, se corrió un gel de agarosa usando materiales libres de RNAsas y un *buffer* de carga para ARN (*Gel Loading Buffer II*, Ambion AM8546G-AM8547). El gel de agarosa al 1.5% se preparó con *buffer* MOPS. Además, se lavó la cuba, la cama y el peine con una solución de NaOH 0.5 M y SDS 1%.

2.4.4. Síntesis de ADNc

40 µg del ARN total obtenido en la extracción fueron utilizados para la construcción del ADN copia, utilizando como *primers* oligo(dT) y la transcripta inversa *SuperScript™ III* (Invitrogen). En primer lugar, se mezcló el ARN junto con la cantidad necesaria de oligo(dT) y se incubó a 65°C durante 5 min para desestabilizar estructuras secundarias del ARN. A continuación, se agregaron los siguientes reactivos para realizar RT-PCR:

Reactivo	1X
5x 1st strand buffer	44 µl
0.1 M DTT	22 µl

dNTP (10 mM cada uno)	11 μ l
Inhibidor de RNAsas (40 U/ μ l)	5.5 μ l
Transcriptasa Reversa (200 U/ μ l)	11 μ l
Total	c.s.p 200 μ l

Se incubó la reacción a 55°C durante 60 min y luego a 70°C durante 15 min para inactivar la transcriptasa reversa.

2.4.5. Amplificación de fragmentos VHH por PCR anidada

A partir del *pool* de cDNA obtenido anteriormente se amplificaron las secuencias que codifican para los genes VHHs. En una primera reacción de PCR se amplificaron dos fragmentos, uno de aproximadamente 0.7 kb (correspondiente a la región VHH y *hinge* de los anticuerpos de cadena pesada) y otro de aproximadamente 0.9 kb (correspondiente a la región VH, CH1 y *hinge* correspondiente a la cadena pesada de los anticuerpos convencionales). Para ello, se prepararon 9 tubos de PCR en paralelo: 4 duplicados para cada muestra de cDNA y un negativo.

Reactivo	1X	10X
H ₂ O	c.s.p. 50 μ l	500 μ l
Buffer 10x	5 μ l (20 mM MgCl ₂)	50 μ l
dNTP (10 mM cada uno)	1 μ l (con. final 0.2 mM)	10 μ l
Primer CALL01 (20 μ M)	1 μ l (con. final 0.4 μ M)	10 μ l
Primer CALL02 (20 μ M)	1 μ l (con. final 0.4 μ M)	10 μ l
Taq DNA polimerasa	0.25 μ l (1.25 U)	2.5 μ l
cDNA	0.5, 1, 2, o 4 μ l (x2)	Ajustar las cantidades

Paso	Temperatura (°C)	Duración (min)	Ciclos
Desnaturalización	95	3	1
	94	1	
Amplificación	55	1	32
	72	1	
Elongación	72	10	1

Para evaluar la amplificación de las cadenas variables pesadas por PCR se tomaron 8 μ l de cada tubo para correr en un gel de agarosa al 1% en *buffer* TBE. Al confirmar la presencia de ambas bandas (0.7 y 0.9 kb) en el gel de agarosa, se corrió el *pool* de PCR

positivas en un gel de purificación (agarosa al 0.8%). Se cortó la banda de PCR de aproximadamente 700 pb con un bisturí y se extrajo el ADN utilizando el *kit* comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), de acuerdo con el protocolo del fabricante.

A continuación, este fragmento de ADN purificado se utilizó como templado en la PCR anidada. Para ello, se prepararon 10 tubos de PCR en paralelo en donde se evaluaron diferentes cantidades de templado: 3 triplicados para 10 ng, 20 ng y 40 ng respectivamente y un negativo.

Reactivo	1X	11X
H ₂ O	c.s.p. 50 µl	500 µl
Buffer 10x	5 µl (20 mM MgCl ₂)	55 µl
dNTP (10 mM cada uno)	1 µl (con. final 0.2 mM)	10 µl
Primer VHH-Fw-SapI (20 µM)	1 µl (con. final 0.4 µM)	11 µl
Primer VHH-Back-SapI (20 µM)	1 µl (con. final 0.4 µM)	11 µl
Taq DNA polimerasa	0.25 µl (1.25 U)	2.75 µl
Producto de la primera PCR	10, 20 ó 40 ng	Ajustar las cantidades

Paso	Temperatura (°C)	Duración (minutos)	Ciclos
Desnaturalización	95	3	1
Amplificación	94	0.45	17-20
	55	0.45	
	72	0.45	
Elongación	72	10	1

Para evaluar la amplificación de la segunda PCR, confirmar la presencia de una banda de aproximadamente 400 pb correspondiente al tamaño de los VHHs y purificar el ADN se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente. Esta segunda PCR introdujo los sitios de la enzima de restricción SapI en los extremos 5' y 3' de los amplicones VHH para la ligación en el vector fagémido pMECS-GG.

2.4.6. Clonado de fragmentos VHHs en plásmido fagémidos

Los fragmentos VHHs purificados se clonaron en el vector pMECS-GG, el cual se obtuvo a partir de una modificación del vector pMECS al cual se le introdujo un “*killer cassette*” flanqueado por sitios de enzima de restricción Sap I dentro del sitio de clonado múltiple.

Este tipo de clonado se fundamenta en la utilización de una enzima de restricción de tipo II, cuyo sitio de corte dentro del ADN se encuentra por fuera de su sitio de reconocimiento. Esta cualidad permite que el usuario diseñe y defina los extremos cohesivos que luego se unirán en el plásmido, generando un alto grado de especificidad y direccionalidad en la reacción de ligación utilizando una única enzima de restricción. Los fragmentos VHHs obtenidos en la PCR anidada se digirieron y ligaron en una única reacción. Para esto se utilizó un protocolo previamente puesto a punto en el laboratorio de inmunología molecular de la Universidad Libre de Bruselas (VUB) [444]. En estas reacciones se evaluaron tres proporciones molares de ADN de Nb a clonar: plásmido, 3:1; 2:1; 1:1.

Reactivo	3:1	2:1	1:1
H ₂ O	c.s.p. 100 µl	c.s.p. 100 µl	c.s.p. 100 µl
Buffer CS 10x	10 µl	10 µl	10 µl
ATP (10 mM)	5 µl	5 µl	5 µl
Segunda PCR	x µl (5.2 µg)	x µl (2.4 µg)	x µl (1.7 µg)
pMECS-GG	x µl (4 µg)	x µl (4 µg)	x µl (4 µg)
SapI	25 µl (250 U)	25 µl (250 U)	25 µl (250 U)
T4 DNA ligasa	2.5 µl (15 U)	2.5 µl (15 U)	2.5 µl (15 U)

La reacción se llevó a cabo en ciclos alternando entre la temperatura óptima de digestión y la temperatura óptima de ligación.

Paso	Temperatura (°C)	Duración (min)	Ciclos
Digestión	37	30	18
Ligación	18	30	
Ligación final	18	60	1
Inactivación	50	10	1
	80	10	

Luego de finalizada la reacción se purificaron los productos de la ligación. Para ello, se agregó un volumen (100 µl) de fenol saturado con TE (fase inferior), se mezcló vigorosamente y se centrifugó durante 10 min a 18.000 x g para separar las fases. Se transfirió la fase acuosa superior a un nuevo tubo eppendorf y se agregaron 100 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Nuevamente se mezcló vigorosamente y se centrifugó por 10 min a 18.000 x g. Se transfirió la fase acuosa superior a un tubo

eppendorf, se agregaron 20 µl de acetato de sodio 3 M (pH 5.2, dilución 1/10) y se mezcló la reacción pipeteando. Seguido a este, se añadieron 250 µl de etanol absoluto (2.5 volúmenes) y se incubó durante a -80°C al menos 30 min.

Se centrifugó la mezcla durante 20 min a 18.000 x g y se retiró con cuidado todo el líquido con una micropipeta. Se secó el *pellet* a TA y se disolvió el DNA en 50 µl de H₂O. Los productos obtenidos se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

Con el fin de evaluar las tres condiciones de ligación, se realizaron transformaciones de prueba con bacterias *E. coli* TG1 electrocompetentes generadas en el laboratorio. Brevemente, alícuotas de 50 µl de bacterias fueron electroporadas junto con 1 µl de cada ligación con un pulso de 1.8 KV. Luego de la electroporación se reconstituyeron las bacterias con 975 µl de medio SOC durante 1 h a 37 °C con agitación. Las bacterias reconstituídas de cada ligación se utilizaron para hacer 4 diluciones seriadas en base 10 y 100 µl de cada dilución se sembraron por duplicado en placas de LB agar con ampicilina. Al día siguiente se contó la cantidad de colonias en las placas de la última dilución con crecimiento y se hizo un promedio para conocer la condición de ligación con el mejor rendimiento. Al mismo tiempo se realizó una *colony* PCR a partir de 48 colonias de cada una de las distintas condiciones de ligación para calcular el porcentaje de inserción correcta dentro del plásmido para cada reacción. Para esto se utilizaron los *primers* MP57 y GIII que se hibridan en el plásmido pMECS y pMECS-GG por fuera de la secuencia de ADN clonado.

Reactivo	1X
H ₂ O	c.s.p. 1250 µl
<i>Buffer</i> 10x	125 µl (20 mM MgCl ₂)
dNTP (10 mM cada uno)	12.5 µl (con. final 0.2 mM)
<i>Primer</i> MP57 (20 µM)	25 µl (con. final 0.4 µM)
<i>Primer</i> GIII (20 µM)	25 µl (con. final 0.4 µM)
Taq DNA polimerasa	6.25 µl (1.25 U)

Paso	Temperatura (°C)	Duración (min)	Ciclos
Desnaturalización	95	5	1
Amplificación	94	0.45	28
	55	0.45	
	72	0.45	

Elongación	72	10	1
------------	----	----	---

2.4.7. Construcción de la biblioteca de VHHs

Los productos de ligación de cada biblioteca con el mejor rendimiento en términos de tamaño y porcentaje de inserción de fragmentos correctos fueron utilizados para construir la biblioteca de VHHs. Para esto se llevaron a cabo 12 electroporaciones utilizando 25 µl de bacterias *E. coli* TG1 electrocompetentes comerciales (Lucigen #Cat.: 60502) y 6.25 µl de producto de ligación. El voltaje de los pulsos fue de 1.8 KV y se registraron las duraciones de los pulsos. Luego de cada pulso se reconstituyeron las bacterias en un volumen final de 1 ml de medio SOC y se volcaron en un mismo tubo. Los 12 ml resultantes fueron incubados 1 h a 37°C para regenerar las membranas de las bacterias. Luego se sembró la totalidad de cada biblioteca en 6 placas de cultivo cuadradas grandes conteniendo medio LB agar adicionado con glucosa 1% p/v y ampicilina 100 µg/ml. Al mismo tiempo con alícuotas de 100 µl de cada biblioteca se realizaron diluciones seriadas en base 10 por duplicado, con el objetivo de calcular el tamaño de la biblioteca generada. Todas las placas fueron incubadas durante toda la noche a 37 °C.

Las placas conteniendo las bibliotecas fueron cosechadas utilizando un raspador o rastrillo y medio LB. Se juntó toda la capa de bacterias que se formó sobre el agar de las placas cuadradas grandes en un tubo de ensayo y se pasó por un filtro de 70 µm para eliminar restos de agar. Luego se agregó glicerol hasta llevarlo a una concentración de 15 % v/v. Finalmente, la biblioteca se alicuotó en fracciones de 2 ml que se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

2.4.8. Selección de VHHs por la tecnología de *display* en fago

Los Nbs específicos para las proteínas S-2P y RBD de SARS-CoV-2 fueron seleccionado de la biblioteca *Spike*, utilizando la tecnología de *display* de fagos. Para esto se inocularon 200 ml de medio 2xTY suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y 2% (p/v) con 200 µl de bacterias de la biblioteca. Al alcanzar una DO₆₀₀ de 0.6, las bacterias se superinfectaron con 4×10¹⁰ u.f.p. del fago *helper* VCSM13. Después de la centrifugación para eliminar los rastros de glucosa, el *pellet* bacteriano se resuspendió en 2xTY suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y 25 µg/ml de kanamicina y se incubó durante la noche a 37°C y 200 rpm. Al día siguiente, los fagos recombinantes se purificaron mediante precipitación con PEG 6000 al 20% (p/v) /2.5 M NaCl. Las progenies de fagos producidos expresaron el

repertorio de Nbs de cada biblioteca como proteínas de fusión con la proteína gIIIp de su cápside.

Para enriquecer la biblioteca en clones específicos, se realizaron 3 rondas de selección. Para ello se sensibilizaron placas de ELISA de 96 pocillos *Nunc Maxisorp* con 0.2 µg de proteína recombinante S-2P o RBD. Como control negativo, los pocillos se recubrieron con sobrenadantes de células HEK-293T no transfectadas o levaduras no transformadas, respectivamente. Al día siguiente, los pocillos se lavaron 4 veces con PBST y se bloquearon con 10% de leche descremada en PBST para la primera ronda, 1% OVA en PBST para la segunda ronda y ELISA *Blocker Blocking Buffer* (*Thermo Scientific*) para la tercera ronda. Aproximadamente 1×10^{12} fagos en 100 µl de solución de bloqueo se añadieron e incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Durante la primera ronda de *panning*, los pocillos se lavaron 10 veces con PBST, mientras que se realizaron 20 lavados en la segunda y tercera rondas. Los fagos restantes se eluyeron con trietilamina (TEA) 100 mM pH 10 (Sigma, T0886) durante 4 min, seguido de neutralización con Tris-HCl 1 M pH 8.

Después de cada ronda de *panning*, los fagos se amplificaron mediante infección de células *E. coli* TG1 en crecimiento exponencial y superinfección con fago *helper* VCSM13. Después de la centrifugación para eliminar la glucosa, las bacterias se cultivaron durante la noche en presencia de los antibióticos ampicilina y kanamicina. Al día siguiente, los fagos se purificaron mediante precipitación con PEG/NaCl y se utilizaron para la siguiente ronda de selección.

La selección de ligandos específicos se realizó mediante ELISA en 96 colonias individuales seleccionadas al azar de la segunda y tercera ronda de *panning*, utilizando tanto extracto periplásmico (PE) como fagos recombinantes (rP). Para preparar PE, se inocularon colonias individuales en 1 ml de medio 2xTY que contenía 100 µg/ml de ampicilina y 0.1% de glucosa en una placa de pozos profundos de 96 pocillos. Después de incubar durante 3 hs a 37°C y 200 rpm., se añadió isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1 mM para inducir la expresión de los Nbs durante 4 hs. Los *pellets* bacterianos se congelaron y descongelaron 2 veces para lisar las células y se resuspendieron en 100 µl de PBS. Después del último paso de centrifugación, se recolectó el PE y se utilizó para PE-ELISA (PEE). Por otro lado, para preparar muestras para rP ELISA (rPE), las colonias individuales se cultivaron durante la noche en 0.5 ml de medio 2xTY que contenía 100 µg/ml de ampicilina y 1% de glucosa.

Después de eso, 5 µl de cultivo de cada colonia se diluyeron en 0.5 ml de medio fresco y se cultivaron durante 2 hs antes de ser infectados con 5×10^9 fagos VCSM13/pocillo. Después de 30 min de incubación sin agitación, las placas se centrifugaron durante 15 min a 1800 g para eliminar la glucosa. Las bacterias se cultivaron durante la noche en 2 ml de medio 2xTY que contenía ampicilina y kanamicina. Al día siguiente, los sobrenadantes que contenían los fagos se centrifugaron durante 15 min a 1800 g, y los fagos recombinantes se recuperaron del sobrenadante mediante precipitación con PEG/NaCl.

Los VHHs producidos a partir de PE como rP de colonias individuales se probaron para su unión a las proteínas S-2P o RBD del SARS-CoV-2. Los pocillos de placas de microtitulación MaxiSorp (Nunc, 446469) se recubrieron durante la noche a 4°C con 100 ng/pocillo de proteínas recombinantes (S-2P y RBD) o con una proteína irrelevante como control negativo. Después de lavar con PBST, los pocillos se bloquearon con 10% de leche en polvo descremada en PBST, y se añadieron 100 µl del PE o rP diluido 1:4.

Para la detección de la unión específica de Nb en el PE-ELISA, se utilizó suero de conejo policlonal casero diluido 1:5000, seguido de un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a HRP diluido 1:3000. En el caso del rPE-ELISA, se utilizó un anticuerpo anti-fago M13 marcado con HRP diluido 1:3000 (GE Healthcare, RPN420) como sistema de detección. Después de lavar, se añadieron 100 µl/pocillo de ABTS a las placas y la reacción se detuvo con la adición de SDS al 5%. La absorbancia a 405 nm (Abs_{405}) se midió utilizando un fotómetro de microplacas (*Multiskan™ FC, Thermo Fisher Scientific*).

Para determinar la unión específica, se consideraron positivos los pocillos recubiertos con antígeno cuyo valor de Abs_{405} fuera al menos dos veces mayor que el valor de Abs_{405} de los pocillos de control. Los plásmidos de los clones positivos se transformaron en bacterias DH5α y se caracterizaron mediante una reacción de restricción con *HinfI* antes de enviar las muestras para secuenciación.

2.5. Expresión y purificación de proteínas

2.5.1. Expresión y purificación de proteínas recombinantes en células de mamífero

Los plásmidos se transfectaron transitoriamente en células HEK-293T usando PEI, en una proporción de 1:2.5 de ADN en medio OptiMem como se describió en la sección 2.2.2. El sobrenadante que contenía proteínas recombinantes se recolectó 72 hs post-transfección, se centrifugó durante 20 min a 10,000 g a 4°C, se filtró a través de una

membrana de 0,22 μm y se incubó con resina de afinidad a níquel. Las proteínas se purificaron por flujo gravitacional utilizando columnas de cromatografía Poly-Prep® y se eluyeron usando 300 mM de Imidazol. Las fracciones que contenían las proteínas recombinantes, según el análisis por SDS-PAGE, se combinaron, se dializaron contra PBS y se almacenaron a -80°C .

La proteína SARS-CoV-2 S-2P expresada en un sistema de CHO fue producida por el Dr. Yves Durocher en el Consejo Nacional de Investigaciones de Canadá, como se ha descrito previamente [445]. La expresión de RBD en levadura (yRBD) fue realizada por el consorcio argentino utilizando la cepa X-33 *P. pastoris*, como se ha descrito previamente [446].

2.5.2. Expresión y purificación de Nbs

Todos los Nbs seleccionados y transformados en la cepa de expresión correspondiente (WK6 o BL21) fueron producidos y purificados siguiendo protocolos estandarizados del laboratorio.

Para la expresión de los mismos, una colonia de bacteria de cada Nb se creció en 5 ml de medio LB con ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$ a 37°C toda la noche. A partir de estos cultivos se realizó una dilución 1/100 en 200/500 ml de medio TB suplementado con ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$, glucosa 0.1% v/v y 1 mM MgCl_2 y los mismos se incubaron a 37°C . Cuando los cultivos alcanzaron una DO_{600} de 0,7 – 0,8, se indujo la expresión de los Nbs agregando IPTG a una concentración final de 1 mM. Los Nbs fueron expresados y dirigidos al espacio periplásmico de las bacterias por 16 hs a 28°C con agitación. Al día siguiente, los cultivos se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 min para eliminar el medio líquido y procesar el *pellet* bacteriano para extraer y purificar los Nbs.

Los *pellets* de bacterias se resuspendieron en 15 ml de TES/litro de cultivo y se incubaron en agitación durante 2 hs en hielo. A continuación, se realizó el *shock* osmótico para obtener el contenido del espacio periplásmico de las bacterias, agregando 4 volúmenes de agua e incubando en agitación durante 3 hs en hielo. Los extractos se centrifugaron a 10000 rpm durante 15 min y el sobrenadante obtenido se incubó con resina de Ni^{2+} y 10 mM de Imidazol a 4°C durante toda la noche para permitir la unión por coordinación de los Nbs, conteniendo una etiqueta de 6xHis, al catión de Ni^{2+} . Los Nbs se purificaron por flujo gravitacional utilizando columnas de cromatografía Poly-Prep®, en donde se realizaron 3 lavados con 10 volúmenes de resina de *buffer* de lavado y se eluyeron usando 300 mM de Imidazol. Como paso final de la purificación y con el objetivo de eliminar el

imidazol y cambiar el *buffer* en el que se encuentran, los Nbs fueron dializados contra PBS dentro de membranas semipermeables de MWCO de 12 KDa. Los Nbs puros fueron almacenados a -20 °C hasta su utilización. El proceso de producción y purificación fue monitoreado por SDS-PAGE.

Para la biotinilación de Nbs se siguió el mismo protocolo de cultivo e inducción descrito anteriormente. Tras la inducción, las células se recolectaron por centrifugación a 6000 rpm durante 15 min. El *pellet* resultante se resuspendió en PBS con 100 µM de biotina. Para provocar la lisis celular y facilitar la liberación de los Nbs y la enzima BirA, se realizaron 3 ciclos de congelamiento/descongelamiento (a -80 °C o -20 °C y a temperatura ambiente, respectivamente). A continuación, se incubó la muestra a 37°C durante 30 min sin agitación para permitir que la ligasa BirA catalice la unión específica de la biotina a los Nbs. Finalmente, las células lisadas se centrifugaron nuevamente, y el sobrenadante que contiene los Nbs biotinilados se purificó mediante IMAC.

2.6. Caracterización de Nbs

2.6.1. Ensayos de unión al antígeno

Para evaluar la capacidad de unión de los Nbs seleccionados a las proteínas S-2P, RBD o NS1 de los 4 serotipos de DENV, se recubrieron microplacas de 96 pocillos con 2 µg/ml de proteína recombinante en un *buffer* de carbonato/bicarbonato pH 9.6 y se incubaron durante la noche a 4°C. Las placas se bloquearon con *buffer* de bloqueo durante 1 h a 37°C. Los Nbs purificados se ajustaron a una concentración de 1 µM y se realizaron diluciones seriadas en base 2, 5 o 10 que se añadieron a las placas recubiertas y se incubaron durante 1 h a 37°C. Para los ensayos de unión a las proteínas de SARS-CoV-2, se añadió un suero policlonal de conejo contra Nbs (1:2000), seguido por un anticuerpo IgG de cabra anti-conejo conjugado a HRP (1:5000). Para los ensayos de unión a NS1, se agregó un anticuerpo anti-Nb conjugado a HRP (1:8000). Todas las incubaciones se realizaron a 37°C. La reacción se desarrolló con el sustrato TMB y se detuvo con 1 M H₂SO₄, midiendo la absorbancia a 450 nm. El EC₅₀ se estimó utilizando un modelo de regresión log-logística de cuatro parámetros (AAT Bioquest, Inc., Pleasanton, CA, USA., *Quest Graph IC50 Calculator*).

2.6.2. Ensayo de inhibición viral por actividad de la NA (AVINA)

El ensayo de inhibición viral basado en la actividad de la neuraminidasa (AVINA) se llevó a cabo para evaluar la capacidad de los Nbs de inhibir la actividad enzimática de la NA del virus de influenza A. Este método se basa en la cuantificación de la actividad

de la NA mediante el sustrato fluorogénico MUNANA (2'-(4-Metilumbeliferil)- α -D-N-acetilneuraminic acid), que emite fluorescencia al ser hidrolizado por la enzima activa.

Inicialmente, los virus fueron incubados con diluciones seriadas de Nbs, comenzando con una concentración inicial de 2 μ M, durante 1 h a 37 °C. La mezcla de reacción se agregó a células MDCK presentes en una microplaca de 96 pocillos sembradas el día anterior.

Veinticuatro horas luego de la infección, se recolectaron 25 μ l de sobrenadante y se trasladaron a otra microplaca de 96 pocillos. Posteriormente, se añadió MUNANA a una concentración final de 100 μ M y la reacción se mantuvo a 37°C durante 30 min. La hidrólisis del sustrato fue detenida mediante la adición de 100 μ l de una solución de Na₂CO₃ a 0.1 M. La actividad de la NA fue evaluada mediante la lectura de la fluorescencia utilizando un lector de placas (excitación: 365 nm; emisión: 450 nm).

La inhibición de la actividad de la NA se calculó comparando la fluorescencia medida en las muestras tratadas con Nbs frente a los controles sin Nbs. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición relativa, calculado con respecto a la actividad enzimática del control sin Nb.

2.6.3. Ensayo de microneutralización viral (MN)

Para el ensayo de MN viral, las células MDCK se sembraron en microplacas de 96 pocillos el día anterior al experimento. Los diferentes formatos de Nbs o anticuerpos anti-HA de IAV se diluyeron en serie al doble y se mezclaron con un mismo volumen de virus (100 TCID₅₀/pocillo) en medio DMEM sin suero. La mezcla se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Tras la incubación, la mezcla se agregó a las células.

Setenta y dos horas post-infección, se retiró el medio de cultivo y las células se fijaron y permeabilizaron con paraformaldehído al 2% durante 20 min. Posteriormente, se permeabilizaron con Tritón al 0,5% durante 10 min. Luego de 2 lavados con PBS-T, las microplacas se bloquearon con *buffer* de bloqueo durante 1 h. A continuación, se añadió un anticuerpo monoclonal anti-ribonucleoproteína (1:2500), seguido por un anticuerpo IgG de ratón anti-cabra conjugado a HRP (1:5000). La reacción se desarrolló con el sustrato TMB y se detuvo con 1 M H₂SO₄, midiendo la absorbancia a 450 nm. Los valores de absorbancia obtenidos se utilizaron para calcular la concentración inhibitoria media (IC₅₀) de los anticuerpos o Nbs probados, evaluando su capacidad neutralizante.

2.6.4. Ensayo de neutralización viral utilizando pseudovirus

Para estudiar la capacidad neutralizante de los Nbs anti-SARS-CoV-2, se prepararon diluciones seriadas al medio de estos (de manera individual o en combinación), partiendo de una concentración de 1 μ M, en triplicado, en 50 μ l de medio OptiMem, y se combinaron con un volumen igual de pseudovirus titulados. Esta mezcla se incubó durante 2 hs a 37°C y luego se añadió a células HEK-293T previamente transfectadas con plásmidos que codifican el receptor ACE2 y la proteasa TMPRSS2 (VRC9260, NIH). Cuarenta y ocho horas después, las células se observaron bajo el microscopio (IX-71 OLYMPUS), y las células GFP-positivas se contaron automáticamente con ImageJ.

El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente fórmula: $100 \times [1 - (X - \text{MIN}) / (\text{MAX} - \text{MIN})]$, donde X representa el número de células GFP-positivas a una concentración dada de Nb, y MIN y MAX se refieren al número de células GFP-positivas en células no infectadas o en células transducidas solo con pseudovirus, respectivamente. Los títulos de IC₅₀ se determinaron basándose en la regresión no lineal sigmoideal utilizando el *software GraphPad Prism Inc* (La Jolla, CA, USA) [447].

2.6.5. Ensayo de neutralización viral (VNA)

Los ensayos de neutralización viral se realizaron utilizando el aislado hCoV-19/Argentina/PAIS-C0102/2020 (D614G). Se sembraron células Vero a una densidad de 1.5×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 24 hs a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂. Se realizaron diluciones seriadas al medio de los Nbs (concentración inicial de 10 μ M) y se incubaron con 100 TCID₅₀ del virus durante 1 h a 37°C en DMEM suplementado con 2% de suero fetal bovino (SFB), penicilina/estreptomicina y 10 μ g/ml de anfotericina B. Las células fueron infectadas con la mezcla de virus/Nb y se incubaron durante 1 h a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente, se eliminó el inóculo mediante lavados y las células se incubaron en DMEM con 2% de SFB durante 72 hs a 37°C hasta que se observó un efecto citopático (ECP). Seguido a esto, se fijaron las células con acetona al 70% y la replicación viral fue confirmada mediante tinción por inmunofluorescencia usando un suero policlonal de IgG de llama marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) producido contra la proteína S-2P del SARS-CoV-2. El título neutralizante se calculó como el inverso de la mayor dilución que mostró fluorescencia positiva, comparable a las células Vero no infectadas.

Por otra parte, se realizó un ensayo PRNT utilizando el aislado de Estados Unidos (USA-WA1/2020, NR-52281). Para ello, se realizaron diluciones seriadas al medio de los Nbs en DMEM suplementado con 2% de SFB (concentración inicial de 1 μ M) y se incubaron

con una suspensión viral que contenía 100 unidades formadoras de placas del virus SARS-CoV-2 durante 72 hs a 37°C. Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 min a 4 °C y teñidas con una solución de cristal violeta en metanol. El CPE se evaluó visualmente, considerando el daño menor a la monocapa (1–2 placas) como una manifestación de CPE. El título de neutralización se definió como la mayor dilución de suero sin CPE en dos de tres pocillos replicables. La cantidad de células infectadas por pocillo se determinó contando áreas localizadas de aclaramiento en la monocapa de células no teñidas por el cristal violeta. Los valores de PRNT₅₀ fueron calculados usando el programa *NIAID Calculator*. La concentración inhibitoria máxima se estableció en una reducción del 90% (IC₉₀) en el CPE detectado mediante microscopía de campo claro, correspondiente también a la misma reducción en unidades formadoras de foco fluorescente.

2.6.6. Ensayos de competencia

• ACE2-RBD

Para determinar si los Nbs impiden la interacción entre la proteína RBD de SARS-CoV-2-RBD y su receptor ACE2, se estableció una prueba de neutralización viral basada en la técnica ELISA. Para ello, se recubrieron microplacas de 96 pocillos con 4 µg/ml de RBD en un *buffer* de carbonato/bicarbonato pH 9.6 y se incubaron durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron 3 veces con PBST y se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con leche descremada al 3%.

A continuación, se añadieron diluciones seriadas al medio de Nbs específicos e irrelevantes (concentración inicial de 1 µM) a los pocillos y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. El ACE2-HRP recombinante producido en células HEK-293T se incubó durante 2 hs a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 3 veces con PBST, y se agregó el sustrato TMB durante 15 min. La reacción se detuvo con 1 M H₂SO₄ y se midió la absorbancia a 450 nm (TECAN, Infinite 200). La cinética de unión se analizó mediante un modelo de regresión no lineal utilizando el software *GraphPad Prism Inc* (La Jolla, CA, USA).

• Biliverdina-S2P

Los Nbs seleccionados con la proteína S-2P y que no se unen a RBD, se estudiaron en un ensayo de competencia de biliverdina basado en ELISA. Para ello, se obtuvo biliverdina IX α (biliverdina) mediante la apertura oxidativa del anillo de hemina IX (Sigma Aldrich, 51280) siguiendo un protocolo reportado [448].

Para el ELISA, se sensibilizaron microplacas de 96 pocillos durante la noche con 0.05 μg de proteína S-2P purificada y al día siguiente, se bloquearon con 1% de leche descremada en PBST. Posteriormente, se añadieron 25 μl de 10 μM de biliverdina a la mitad de los pocillos y se incubaron durante 5 min. Luego se añadieron 25 μl de Nbs diluidos en serie al décimo (concentración inicial de 1 μM) y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. La unión específica se determinó utilizando un anticuerpo anti-HA conjugado con HRP (1:5000), y la reacción se desarrolló con sustrato TMB y se leyó a 450 nm. En un segundo experimento, se mezcló una concentración fija de Nbs (0.1 μM) con una dilución seriada en base 5 de biliverdina (concentración inicial de 25 μM) y la reacción se desarrolló como se mencionó anteriormente.

2.6.7. Mapeo de epítopes

Para determinar los epítopes de unión de los Nbs anti-SARS-CoV-2, se utilizó un arreglo de 181 péptidos que cubre toda la secuencia de aminoácidos de la glicoproteína S del virus (BEI Resources, NR-52402). Los péptidos fueron resuspendidos en 500 μl de DMSO para obtener un *stock* de 2 mg/ml. Las microplacas de 96 pocillos se recubrieron con 100 ng de cada péptido en un *buffer* de carbonato/bicarbonato a pH 9.6 y se incubó toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, los pocillos se lavaron con PBST y se bloquearon los sitios sin proteína utilizando *Starting Block PBS* (Thermo Fisher Scientific, PI37538) durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron los Nbs (100 ng/pocillo) y se incubaron durante 2 hs a temperatura ambiente. La reacción positiva fue desarrollada usando un suero policlonal de conejo anti-Nbs (1:5000), y un anticuerpo anti-IgG de cabra conjugado con HRP (1:5000) o un anti-HisTag-HRP. Tras los lavados, la reacción se desarrolló con TMB y se leyó a 450 nm.

2.7. Técnicas bioinformáticas

2.7.1. Análisis filogenético y del origen germinal de las secuencias de Nbs

Para establecer las relaciones evolutivas y agrupar las secuencias de los Nbs en diferentes clados o grupos, se construyó un árbol filogenético utilizando el *software* MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 11. Las secuencias de los Nbs fueron alineadas previamente utilizando el programa *ClustalW*, y el árbol filogenético fue generado mediante el método *Neighbor joining* con el modelo *p-distance*. La fiabilidad de los árboles obtenidos fue evaluada con un análisis de *bootstrap* de 1000 repeticiones.

Por otra parte, las secuencias de los Nbs fueron introducidas en el programa *IMGT/V-QUEST*, seleccionando como especie *Vicugna pacos* (alpaca) y el locus IGH, para determinar los CDRs de los Nbs y los genes de origen germinal de las regiones variables (V), diversas (D) y de unión (J). Este análisis permitió identificar los alelos germinales correspondientes a cada Nb. De manera complementaria, se utilizó el programa *IMGT/DomainGapAlign*, en el cual las secuencias proteicas se analizaron con una base de datos de *Lama glama*, para obtener información adicional y comparar los resultados del origen germinal con *IMGT/V-QUEST*.

2.7.2. Modelado de secuencias de VHHs

Los Nbs 43, 45 y 53 (Nbs anti-SARS-CoV-2) se modelaron utilizando el sistema de modelado basado en aprendizaje profundo, Nanonet [449]. Se seleccionaron las estructuras mejor calificadas y se refinaron mediante simulación dinámica molecular (DM) de 100 ns utilizando AMBER22. Para mantener la homogeneidad, se utilizaron parámetros idénticos en todos los casos. En primer lugar, cada sistema se optimizó mediante un algoritmo de gradiente conjugado durante 5000 pasos. Posteriormente, se realizaron dos termalizaciones: una DM de volumen constante durante 10 ps a 10 K con una restricción de 50 kcal/mol y una segunda termalización en la que la temperatura del sistema se incrementó gradualmente de 10 a 300 K durante 100 ps. Luego, el sistema fue equilibrado a temperatura y presión constantes durante 250 ps (paso de integración = 0,001 ps/paso) hasta alcanzar la densidad deseada. Se realizó una segunda etapa de equilibrio durante 500 ps con un paso de integración de 2 fs y una constante de fuerza reducida para los átomos alfa-carbono de 2 kcal/mol/Å. Finalmente, se ejecutó una simulación de DM de 10 ns sin restricciones utilizando la técnica de "Repartición de Masa de Hidrógeno" (*Hydrogen Mass Repartition*), lo que permitió un paso de integración de 4 fs. Estas condiciones se aplicaron a la producción de corridas de MD de 1 μs de duración, con 10 pasos por ns y 5000 pasos por simulación. Todas las simulaciones se realizaron con el paquete de programas Amber, utilizando el campo de fuerza ff19SB para todos los residuos AA y el modelo OPCBOX como solvente para las moléculas de agua. Se emplearon el baróstato de Monte Carlo y el termostato de Langevin para mantener presión y temperatura constantes, respectivamente, con parámetros de acoplamiento predeterminados. Se utilizó un corte de 10 Å para las interacciones no enlazadas y se aplicaron condiciones de contorno periódicas mediante el método de sumación *Particle*

Mesh Ewald para las interacciones electrostáticas de largo alcance. Las visualizaciones y el renderizado de imágenes se realizaron con el software VMD.

2.7.3. Docking proteína-proteína

Los estudios de *docking* molecular se llevaron a cabo utilizando HADDOCK (*High Ambiguity Driven protein-protein Docking*) con un modelo semi-flexible y sin restricciones. Se empleó la estructura de la proteína S (6VYB) y se realizaron múltiples corridas de *docking* molecular entre los Nb-43, Nb-45 y Nb-53 contra la proteína S para identificar el mejor resultado en función del puntaje de agrupación RMSD más bajo. Además, se realizó un *docking* molecular de la biliverdina en una región específica de la proteína S (AA 121-207) para evaluar su relevancia biológica. Se realizaron cálculos electrostáticos utilizando una constante dieléctrica dependiente de la distancia, seleccionada por su idoneidad para estudiar interacciones proteína-ligando. No se aplicó refinamiento en agua.

Para cada combinación de Nb y cadena del trímero de la proteína S, se generaron tres resultados diferentes. En cada caso, se seleccionó la mejor opción en función del mejor puntaje y la mejor conformación (*pose*). Además, se tuvo en cuenta que los Nbs se unen al trímero de la proteína S principalmente a través de sus regiones CDR.

2.6.1. Análisis interacciones moleculares con script desarrollado en Python

Para analizar las interacciones moleculares entre los resultados de *docking*, se desarrolló un *script* personalizado en *Python*. El *script* calcula la distancia entre los AA del Nb y la proteína S al calcular el centro de masa de cada residuo dentro de una distancia de 7 Å, generando una lista de residuos potencialmente interactuantes. Esta lista de residuos se importó a VMD, donde se utilizó la herramienta de distancia para determinar la misma entre AA específicos. A partir del conocimiento de las interacciones entre residuos, se infirió qué AA probablemente interactúan entre el Nb y la proteína S, y se identificaron y analizaron los tipos de interacciones entre los AA.

2.8. Desarrollo de un ELISA sándwich para la detección de la proteína NS1

2.8.1. ELISA de captura de la NS1 recombinante

Para determinar las condiciones óptimas del ELISA sándwich y evaluar la capacidad de los Nbs de capturar la NS1, se sensibilizaron microplacas de 96 pocillos con 10 µg/ml de Nbs durante toda la noche a 4°C. A continuación, las microplacas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con diferentes agentes bloqueantes: suero equino o 3% BSA, 1% BSA o 3% leche diluida en PBS-T. Luego de 3 lavados con PBS-T, se agregó 100

ng/pocillo de NS1-2 recombinante y se incubó durante 1 h 30 min a temperatura ambiente. Luego de un nuevo ciclo de lavados, se llevó a cabo una segunda incubación con anticuerpo monoclonal anti-FLAG HRP en una dilución 1:10000 durante 1 h 30 min a temperatura ambiente para la detección de la NS1 capturada. La reacción se desarrolló con el sustrato TMB y se detuvo con 1 M H₂SO₄, midiendo la absorbancia a 450 nm. Para comparar la capacidad de captura de los diferentes anticuerpos generados, se siguió un protocolo similar al detallado anteriormente, con algunas modificaciones. En este caso, las microplacas se sensibilizaron con diluciones seriadas al tercio, comenzando desde una concentración inicial de 800 nM. La cantidad de NS1-2 recombinante para la captura fue de 50 ng/pocillo.

2.8.2. Optimización del ensayo mediante titulación en tablero de ajedrez

La determinación de las concentraciones óptimas de anticuerpo de captura y detector para el ELISA sándwich se llevó a cabo mediante titulaciones en tablero de ajedrez o diluciones en serie en dos dimensiones. Para ello, las microplacas se sensibilizaron durante toda la noche a 4°C con diluciones seriadas en base 2 del Nb-14 Fc, comenzando desde una concentración inicial de 400 o 200 nM. A continuación, se bloquearon con 1% BSA en PBS-T durante 1 h a 37°C. Después de 3 lavados con PBS-T, se agregaron 50 ng/pocillo de NS1-2 recombinante y se incubó durante 1 h 30 min a 37°C. Luego de un nuevo ciclo de lavados, cada concentración de anticuerpo de captura se enfrentó a 6 concentraciones distintas de anticuerpo detector (Nb-48 o Nb-66, en formato Fc HRP o biotinilado): 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml y 25 µg/ml, con una incubación de 1 h 30 min a 37°C. En el caso de los Nbs biotinilados, se realizó una incubación adicional con estreptavidina-HRP en una dilución 1:5000 durante 1 h a 37°C. La reacción se desarrolló con el sustrato TMB y se detuvo con 1 M H₂SO₄, midiendo la absorbancia a 450 nm.

2.8.3. ELISA sándwich para la detección de NS1 de DENV

Para la detección de NS1 de DENV se desarrollaron 3 sistemas de ELISA sándwich, diferenciados por la combinación de anticuerpos utilizados:

- Sistema 1: 50 nM de Nb-14 Fc como anticuerpo de captura y 10 µg/ml de Nb-48 HRP como anticuerpo detector.
- Sistema 2: 25 nM de Nb-14 Fc como anticuerpo de captura y 5 µg/ml de Nb-66 biotinilado como anticuerpo detector.

- Sistema 3: 10 µg/ml de anticuerpo policlonal de conejo anti-NS1 purificado como anticuerpo de captura y 5 µg/ml de Nb-66 biotinilado como anticuerpo detector.

El procedimiento fue idéntico en los tres sistemas. Las microplacas se sensibilizaron con el anticuerpo de captura correspondiente, diluido en el *buffer* carbonato/bicarbonato y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las placas se bloquearon con una solución de 1% BSA en PBS-T durante 1 h a 37°C. Después de 4 lavados con PBS-T, se añadieron 25 ng/pocillo de NS1 recombinante de los 4 serotipos de DENV en matriz de suero negativo, NS1 de ZIKV en una matriz de suero negativo, un *pool* de sueros positivos diluido al medio o muestras positivas y negativas de pacientes, también diluidas al medio. Las placas se incubaron durante 1 h 30 min a 37°C. Tras otro ciclo de lavados, se agregó el anticuerpo detector correspondiente y se incubó durante 1 h 30 min a 37°C. En los sistemas con Nb biotinilado, se realizó una incubación adicional con estreptavidina-HRP diluida 1:5000 en PBS-T durante 1 h a 37°C. La reacción se desarrolló con el sustrato TMB y se detuvo con 1 M H₂SO₄, midiendo la absorbancia a 450 nm.

2.8.4. Validación del ELISA sándwich

La exactitud y el desempeño del ELISA sándwich alternativo desarrollado fueron evaluados por medio del procesamiento con dicho ensayo del grupo de muestras colectadas de pacientes con NS1 positivo (n=101) y negativo (n=70). En cada placa del ensayo se incluyeron dos controles internos, un *pool* de sueros positivos con alta reactividad y un suero negativo con baja reactividad.

Los valores de absorbancia obtenidos fueron utilizados para construir una curva ROC. La exactitud del ensayo fue estimada mediante la determinación del área bajo la curva y su respectivo intervalo de confianza del 95%. El valor de clasificación con el mayor índice de Youden ($J = \text{Sensibilidad} + \text{Especificidad} - 1$), el cual corresponde a la mejor combinación de sensibilidad y especificidad y coincidió con el obtenido por el método “MaxSpSe”, fue establecido como valor de corte del ELISA. La sensibilidad y especificidad utilizando el valor de corte óptimo fueron luego calculadas, junto con sus IC₉₅%. El análisis de datos descrito en este párrafo fue llevado a cabo con el paquete *easyROC* del programa estadístico RStudio (versión 3.6.1).

2.8.5. Determinación de la sensibilidad analítica

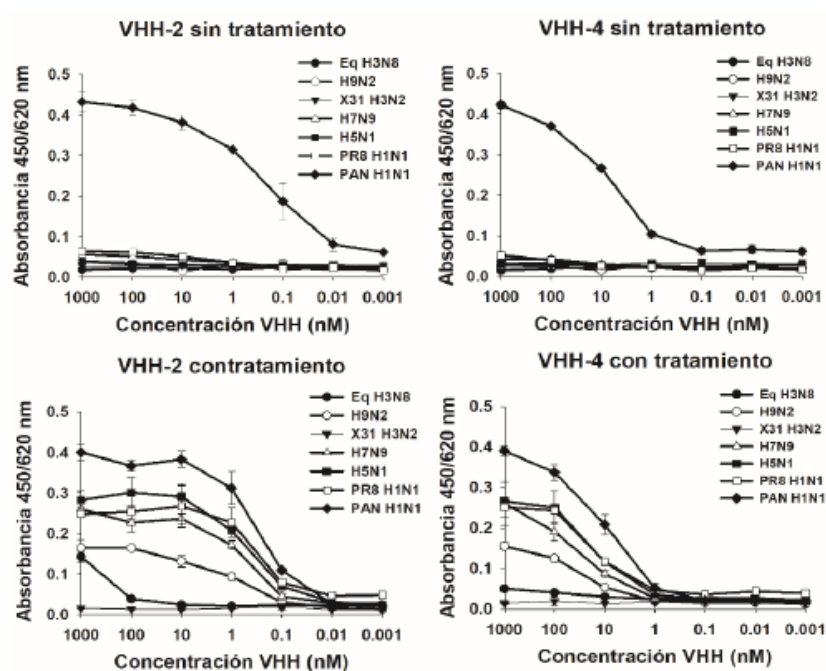
La sensibilidad analítica del ELISA sándwich alternativo se evaluó siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.8.3, utilizando un *pool* de sueros positivos diluidos en serie al medio, desde la dilución 1:2 hasta 1:256. Los valores de absorbancia a 450 nm se

graficaron en función del logaritmo en base 10 del factor de dilución, y se realizó un análisis de regresión no lineal sobre los datos obtenidos.

A su vez, se identificó el rango lineal del ensayo, evaluando la significancia de la relación lineal mediante el cálculo del coeficiente de determinación, junto con los valores correspondientes de pendiente y ordenada al origen, para asegurar la robustez del sistema.

Anexo 1

A continuación, se muestra el estudio de la capacidad de reconocimiento de los Nb-2 y Nb-4 mediante ELISA de partículas virales sensibilizados en las microplacas. Los resultados del ELISA para placas no tratadas, es decir, cuando la HA del virus está completa, muestran que los dos Nbs en estudio únicamente reconocen al virus pandémico H1N1. Sin embargo, al tratar la placa con una solución de pH 5 y DTT, de manera de simular las condiciones necesarias para la entrada del virus a la célula y eliminar la región globular de la HA, se observa que los Nbs tienen reactividad cruzada, al ser capaces de reconocer distintos subtipos del IAV.



Bibliografía

- [1] N. Kobayashi, «Impact of Emerging, Re-Emerging and Zoonotic Viral Infectious Diseases, in a Virologist's Perspective», *Open Virol. J.*, vol. 12, pp. 131-133, 2018, doi: 10.2174/1874357901812010131.
- [2] W.-H. Wang, A. Thitithanyanont, A. N. Urbina, y S.-F. Wang, «Emerging and Re-Emerging Diseases», *Pathog. Basel Switz.*, vol. 10, n.º 7, p. 827, jun. 2021, doi: 10.3390/pathogens10070827.
- [3] M. Trovato, R. Sartorius, L. D'Apice, R. Manco, y P. De Berardinis, «Viral Emerging Diseases: Challenges in Developing Vaccination Strategies», *Front. Immunol.*, vol. 11, p. 2130, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.02130.
- [4] L. Simonsen, «The global impact of influenza on morbidity and mortality», *Vaccine*, vol. 17 Suppl 1, pp. S3-10, jul. 1999, doi: 10.1016/s0264-410x(99)00099-7.
- [5] J. Charostad *et al.*, «A comprehensive review of highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1: An imminent threat at doorstep», *Travel Med. Infect. Dis.*, vol. 55, p. 102638, sep. 2023, doi: 10.1016/j.tmaid.2023.102638.
- [6] R. Chmielewski y D. E. Swayne, «Avian influenza: public health and food safety concerns», *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, vol. 2, pp. 37-57, 2011, doi: 10.1146/annurev-food-022510-133710.
- [7] M. Worobey *et al.*, «Preliminary report on genomic epidemiology of the 2024 H5N1 influenza A virus outbreak in U.S. cattle (Part 2 of 2)», may 2024. Accedido: 3 de septiembre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://virological.org/t/preliminary-report-on-genomic-epidemiology-of-the-2024-h5n1-influenza-a-virus-outbreak-in-u-s-cattle-part-1-of-2/970>
- [8] L. Guan *et al.*, «Cow's Milk Containing Avian Influenza A(H5N1) Virus - Heat Inactivation and Infectivity in Mice», *N. Engl. J. Med.*, vol. 391, n.º 1, pp. 87-90, jul. 2024, doi: 10.1056/NEJMc2405495.
- [9] A. J. Einfeld *et al.*, «Pathogenicity and transmissibility of bovine H5N1 influenza virus», *Nature*, pp. 1-7, jul. 2024, doi: 10.1038/s41586-024-07766-6.
- [10] Organización de las Naciones Unidas, «Análisis Conjunto Del Sistema De Naciones Unidas 2021: Los Efectos De La Pandemia Por Covid-19 En La Argentina», Argentina, sep. 2021. Accedido: 21 de agosto de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://argentina.un.org/es/145708-an%C3%A1lisis-conjunto-del-sistema-de-naciones-unidas-2021-los-efectos-de-la-pandemia-por-covid>
- [11] Centro de Información de las Naciones Unidas para Argentina y Uruguay (CINU) y Oficina del Coordinador Residente (OCR), «Reporte Anual de Resultados 2021 del Sistema de Naciones Unidas en Argentina», Argentina, abr. 2022. Accedido: 21 de agosto de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://argentina.un.org/es/178014-reporte-anual-de-resultados-2021-del-sistema-de-naciones-unidas-en-argentina>
- [12] C. Hamers-Casterman *et al.*, «Naturally occurring antibodies devoid of light chains», *Nature*, vol. 363, n.º 6428, pp. 446-448, jun. 1993, doi: 10.1038/363446a0.
- [13] A. S. Greenberg, A. L. Hughes, J. Guo, D. Avila, E. C. McKinney, y M. F. Flajnik, «A novel "chimeric" antibody class in cartilaginous fish: IgM may not be the primordial immunoglobulin», *Eur. J. Immunol.*, vol. 26, n.º 5, pp. 1123-1129, may 1996, doi: 10.1002/eji.1830260525.
- [14] S. D. Nuttall, «Overview and discovery of IgNARs and generation of VNARs», *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 911, pp. 27-36, 2012, doi: 10.1007/978-1-61779-968-6_3.
- [15] L. Riechmann y S. Muyldermans, «Single domain antibodies: comparison of camel VH and camelised human VH domains», *J. Immunol. Methods*, vol. 231, n.º 1-2, pp. 25-38, dic. 1999, doi: 10.1016/s0022-1759(99)00138-6.
- [16] A. de Marco, «Biotechnological applications of recombinant single-domain antibody fragments», *Microb. Cell Factories*, vol. 10, p. 44, jun. 2011, doi: 10.1186/1475-2859-10-44.

- [17] S. Muyldermans, T. Atarhouch, J. Saldanha, J. A. Barbosa, y R. Hamers, «Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains», *Protein Eng.*, vol. 7, n.º 9, pp. 1129-1135, sep. 1994, doi: 10.1093/protein/7.9.1129.
- [18] C. Vincke, R. Loris, D. Saerens, S. Martinez-Rodriguez, S. Muyldermans, y K. Conrath, «General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold», *J. Biol. Chem.*, vol. 284, n.º 5, pp. 3273-3284, ene. 2009, doi: 10.1074/jbc.M806889200.
- [19] K. B. Vu, M. A. Ghahroudi, L. Wyns, y S. Muyldermans, «Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies», *Mol. Immunol.*, vol. 34, n.º 16, pp. 1121-1131, nov. 1997, doi: 10.1016/S0161-5890(97)00146-6.
- [20] E. Y. Yang y K. Shah, «Nanobodies: Next Generation of Cancer Diagnostics and Therapeutics», *Front. Oncol.*, vol. 10, jul. 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.01182.
- [21] M. F. Flajnik, N. Deschacht, y S. Muyldermans, «A Case Of Convergence: Why Did a Simple Alternative to Canonical Antibodies Arise in Sharks and Camels?», *PLOS Biol.*, vol. 9, n.º 8, p. e1001120, ago. 2011, doi: 10.1371/journal.pbio.1001120.
- [22] T. T. Wu, G. Johnson, y E. A. Kabat, «Length distribution of CDRH3 in antibodies», *Proteins*, vol. 16, n.º 1, pp. 1-7, may 1993, doi: 10.1002/prot.340160102.
- [23] A. Desmyter *et al.*, «Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme», *Nat. Struct. Biol.*, vol. 3, n.º 9, pp. 803-811, sep. 1996, doi: 10.1038/nsb0996-803.
- [24] J. R. Ingram, F. I. Schmidt, y H. L. Ploegh, «Exploiting Nanobodies' Singular Traits», *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 36, pp. 695-715, abr. 2018, doi: 10.1146/annurev-immunol-042617-053327.
- [25] L. S. Mitchell y L. J. Colwell, «Analysis of nanobody paratopes reveals greater diversity than classical antibodies», *Protein Eng. Des. Sel. PEDS*, vol. 31, n.º 7-8, pp. 267-275, jul. 2018, doi: 10.1093/protein/gzy017.
- [26] L. S. Mitchell y L. J. Colwell, «Comparative analysis of nanobody sequence and structure data», *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, vol. 86, n.º 7, pp. 697-706, 2018, doi: 10.1002/prot.25497.
- [27] Y. Wu, S. Jiang, y T. Ying, «Single-Domain Antibodies As Therapeutics against Human Viral Diseases», *Front. Immunol.*, vol. 8, p. 1802, 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.01802.
- [28] S. Muyldermans, «Nanobodies: natural single-domain antibodies», *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 82, pp. 775-797, 2013, doi: 10.1146/annurev-biochem-063011-092449.
- [29] M. M. Harmsen y H. J. De Haard, «Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments», *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 77, n.º 1, pp. 13-22, nov. 2007, doi: 10.1007/s00253-007-1142-2.
- [30] K. S. Rutgers *et al.*, «Transmigration of beta amyloid specific heavy chain antibody fragments across the in vitro blood-brain barrier», *Neuroscience*, vol. 190, pp. 37-42, sep. 2011, doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.05.076.
- [31] S. Muyldermans, «A guide to: generation and design of nanobodies», *FEBS J.*, vol. 288, n.º 7, pp. 2084-2102, abr. 2021, doi: 10.1111/febs.15515.
- [32] Z. Li *et al.*, «An Unbiased Immunization Strategy Results in the Identification of Enolase as a Potential Marker for Nanobody-Based Detection of *Trypanosoma evansi*», *Vaccines*, vol. 8, n.º 3, Art. n.º 3, sep. 2020, doi: 10.3390/vaccines8030415.
- [33] T. Eden *et al.*, «A cDNA Immunization Strategy to Generate Nanobodies against Membrane Proteins in Native Conformation», *Front. Immunol.*, vol. 8, p. 1989, 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.01989.
- [34] E. Pardon *et al.*, «A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology», *Nat. Protoc.*, vol. 9, n.º 3, pp. 674-693, mar. 2014, doi: 10.1038/nprot.2014.039.

- [35] M. Arbabi Ghahroudi, A. Desmyter, L. Wyns, R. Hamers, y S. Muyldermans, «Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies», *FEBS Lett.*, vol. 414, n.º 3, pp. 521-526, sep. 1997, doi: 10.1016/s0014-5793(97)01062-4.
- [36] G. P. Smith, «Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface», *Science*, vol. 228, n.º 4705, pp. 1315-1317, jun. 1985, doi: 10.1126/science.4001944.
- [37] L. Ledsgaard, M. Kilstrup, A. Karatt-Vellatt, J. McCafferty, y A. H. Laustsen, «Basics of Antibody Phage Display Technology», *Toxins*, vol. 10, n.º 6, p. 236, jun. 2018, doi: 10.3390/toxins10060236.
- [38] I. B. B. Silva *et al.*, «Phage Display as a Strategy to Obtain Anti-flavivirus Monoclonal Antibodies», en *Dengue Fever in a One Health Perspective*, IntechOpen, 2020. doi: 10.5772/intechopen.93076.
- [39] R. Doshi, B. R. Chen, C. R. T. Vibat, N. Huang, C.-W. Lee, y G. Chang, «In vitro nanobody discovery for integral membrane protein targets», *Sci. Rep.*, vol. 4, n.º 1, p. 6760, oct. 2014, doi: 10.1038/srep06760.
- [40] C. McMahon *et al.*, «Yeast surface display platform for rapid discovery of conformationally selective nanobodies», *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 25, n.º 3, pp. 289-296, mar. 2018, doi: 10.1038/s41594-018-0028-6.
- [41] T. Uchański *et al.*, «An improved yeast surface display platform for the screening of nanobody immune libraries», *Sci. Rep.*, vol. 9, n.º 1, p. 382, ene. 2019, doi: 10.1038/s41598-018-37212-3.
- [42] K. A. Henry, J. Tanha, y G. Hussack, «Identification of cross-reactive single-domain antibodies against serum albumin using next-generation DNA sequencing», *Protein Eng. Des. Sel. PEDS*, vol. 28, n.º 10, pp. 379-383, oct. 2015, doi: 10.1093/protein/gzv039.
- [43] X. Chen, M. Gentili, N. Hacohen, y A. Regev, «A cell-free nanobody engineering platform rapidly generates SARS-CoV-2 neutralizing nanobodies», *Nat. Commun.*, vol. 12, n.º 1, p. 5506, sep. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-25777-z.
- [44] M. A. Rossotti *et al.*, «Method for Sorting and Pairwise Selection of Nanobodies for the Development of Highly Sensitive Sandwich Immunoassays», *Anal. Chem.*, vol. 87, n.º 23, pp. 11907-11914, dic. 2015, doi: 10.1021/acs.analchem.5b03561.
- [45] P. Egloff *et al.*, «Engineered peptide barcodes for in-depth analyses of binding protein libraries», *Nat. Methods*, vol. 16, n.º 5, pp. 421-428, may 2019, doi: 10.1038/s41592-019-0389-8.
- [46] M. A. Rossotti *et al.*, «Method for Sorting and Pairwise Selection of Nanobodies for the Development of Highly Sensitive Sandwich Immunoassays», *Anal. Chem.*, vol. 87, n.º 23, pp. 11907-11914, dic. 2015, doi: 10.1021/acs.analchem.5b03561.
- [47] D. Saerens *et al.*, «Engineering camel single-domain antibodies and immobilization chemistry for human prostate-specific antigen sensing», *Anal. Chem.*, vol. 77, n.º 23, pp. 7547-7555, dic. 2005, doi: 10.1021/ac051092j.
- [48] B.-M. Keller *et al.*, «Chromobodies to Quantify Changes of Endogenous Protein Concentration in Living Cells», *Mol. Cell. Proteomics MCP*, vol. 17, n.º 12, pp. 2518-2533, dic. 2018, doi: 10.1074/mcp.TIR118.000914.
- [49] B. Traenkle, S. Segan, F. O. Fagbadebo, P. D. Kaiser, y U. Rothbauer, «A novel epitope tagging system to visualize and monitor antigens in live cells with chromobodies», *Sci. Rep.*, vol. 10, n.º 1, p. 14267, ago. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-71091-x.
- [50] G. Sadeghnezhad *et al.*, «Identification of New DR5 Agonistic Nanobodies and Generation of Multivalent Nanobody Constructs for Cancer Treatment», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, n.º 19, p. 4818, sep. 2019, doi: 10.3390/ijms20194818.
- [51] K. Els Conrath, M. Lauwereys, L. Wyns, y S. Muyldermans, «Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs», *J. Biol. Chem.*, vol. 276, n.º 10, pp. 7346-7350, mar. 2001, doi: 10.1074/jbc.M007734200.

- [52] L. I. Ibañez *et al.*, «Nanobodies With In Vitro Neutralizing Activity Protect Mice Against H5N1 Influenza Virus Infection», *J. Infect. Dis.*, vol. 203, n.º 8, pp. 1063-1072, abr. 2011, doi: 10.1093/infdis/jiq168.
- [53] X. Liu *et al.*, «Development of a nanobody-alkaline phosphatase fusion protein and its application in a highly sensitive direct competitive fluorescence enzyme immunoassay for detection of ochratoxin A in cereal», *Anal. Chem.*, vol. 87, n.º 2, pp. 1387-1394, ene. 2015, doi: 10.1021/ac504305z.
- [54] Y. Sheng *et al.*, «Nanobody-horseradish peroxidase fusion protein as an ultrasensitive probe to detect antibodies against Newcastle disease virus in the immunoassay», *J. Nanobiotechnology*, vol. 17, n.º 1, p. 35, mar. 2019, doi: 10.1186/s12951-019-0468-0.
- [55] B. Rissiek, F. Koch-Nolte, y T. Magnus, «Nanobodies as modulators of inflammation: potential applications for acute brain injury», *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 8, p. 344, oct. 2014, doi: 10.3389/fncel.2014.00344.
- [56] I. Hmila *et al.*, «VHH, bivalent domains and chimeric Heavy chain-only antibodies with high neutralizing efficacy for scorpion toxin Aahl'», *Mol. Immunol.*, vol. 45, n.º 14, pp. 3847-3856, ago. 2008, doi: 10.1016/j.molimm.2008.04.011.
- [57] D. Schumacher, J. Helma, A. F. L. Schneider, H. Leonhardt, y C. P. R. Hackenberger, «Nanobodies: Chemical Functionalization Strategies and Intracellular Applications», *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, vol. 57, n.º 9, pp. 2314-2333, feb. 2018, doi: 10.1002/anie.201708459.
- [58] J. Ries, C. Kaplan, E. Platonova, H. Eghlidi, y H. Ewers, «A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies», *Nat. Methods*, vol. 9, n.º 6, pp. 582-584, jun. 2012, doi: 10.1038/nmeth.1991.
- [59] C. Leduc *et al.*, «A highly specific gold nanoprobe for live-cell single-molecule imaging», *Nano Lett.*, vol. 13, n.º 4, pp. 1489-1494, abr. 2013, doi: 10.1021/nl304561g.
- [60] D. Nevoltris, B. Lombard, E. Dupuis, G. Mathis, P. Chames, y D. Baty, «Conformational Nanobodies Reveal Tethered Epidermal Growth Factor Receptor Involved in EGFR/ErbB2 Predimers», *ACS Nano*, vol. 9, n.º 2, pp. 1388-1399, feb. 2015, doi: 10.1021/nn505752u.
- [61] L. Ma, Y. Sun, X. Kang, y Y. Wan, «Development of nanobody-based flow injection chemiluminescence immunoassay for sensitive detection of human prealbumin», *Biosens. Bioelectron.*, vol. 61, pp. 165-171, nov. 2014, doi: 10.1016/j.bios.2014.04.026.
- [62] W. Kang *et al.*, «Nanobody Conjugates for Targeted Cancer Therapy and Imaging», *Technol. Cancer Res. Treat.*, vol. 20, p. 153303382110101, ene. 2021, doi: 10.1177/15330338211010117.
- [63] E. Yang, Q. Liu, G. Huang, J. Liu, y W. Wei, «Engineering nanobodies for next-generation molecular imaging», *Drug Discov. Today*, vol. 27, n.º 6, pp. 1622-1638, jun. 2022, doi: 10.1016/j.drudis.2022.03.013.
- [64] S. Massa *et al.*, «Site-specific labeling of cysteine-tagged camelid single-domain antibody-fragments for use in molecular imaging», *Bioconjug. Chem.*, vol. 25, n.º 5, pp. 979-988, may 2014, doi: 10.1021/bc500111t.
- [65] K. L. S. Chatalic *et al.*, «A Novel ¹¹¹In-Labeled Anti-Prostate-Specific Membrane Antigen Nanobody for Targeted SPECT/CT Imaging of Prostate Cancer», *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 56, n.º 7, pp. 1094-1099, jul. 2015, doi: 10.2967/jnumed.115.156729.
- [66] A. S. A. van Brussel *et al.*, «Hypoxia-Targeting Fluorescent Nanobodies for Optical Molecular Imaging of Pre-Invasive Breast Cancer», *Mol. Imaging Biol.*, vol. 18, n.º 4, pp. 535-544, ago. 2016, doi: 10.1007/s11307-015-0909-6.
- [67] Y. Vugmeyster *et al.*, «Pharmacokinetic, biodistribution, and biophysical profiles of TNF nanobodies conjugated to linear or branched poly(ethylene glycol)», *Bioconjug. Chem.*, vol. 23, n.º 7, pp. 1452-1462, jul. 2012, doi: 10.1021/bc300066a.

- [68] S. Massa, C. Xavier, S. Muyldermans, y N. Devoogdt, «Emerging site-specific bioconjugation strategies for radioimmunotracer development», *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 13, n.º 8, pp. 1149-1163, ago. 2016, doi: 10.1080/17425247.2016.1178235.
- [69] N. Stephanopoulos y M. B. Francis, «Choosing an effective protein bioconjugation strategy», *Nat. Chem. Biol.*, vol. 7, n.º 12, pp. 876-884, nov. 2011, doi: 10.1038/nchembio.720.
- [70] M. W.-L. Popp y H. L. Ploegh, «Making and breaking peptide bonds: protein engineering using sortase», *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, vol. 50, n.º 22, pp. 5024-5032, may 2011, doi: 10.1002/anie.201008267.
- [71] R. W. Cheloha, T. J. Harmand, C. Wijne, T. U. Schwartz, y H. L. Ploegh, «Exploring cellular biochemistry with nanobodies», *J. Biol. Chem.*, vol. 295, n.º 45, pp. 15307-15327, nov. 2020, doi: 10.1074/jbc.REV120.012960.
- [72] A. Moliner-Morro *et al.*, «Picomolar SARS-CoV-2 Neutralization Using Multi-Arm PEG Nanobody Constructs», *Biomolecules*, vol. 10, n.º 12, p. 1661, dic. 2020, doi: 10.3390/biom10121661.
- [73] L. Hanke *et al.*, «A bispecific monomeric nanobody induces spike trimer dimers and neutralizes SARS-CoV-2 in vivo», *Nat. Commun.*, vol. 13, n.º 1, p. 155, ene. 2022, doi: 10.1038/s41467-021-27610-z.
- [74] M. Rashidian *et al.*, «Noninvasive imaging of immune responses», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, n.º 19, pp. 6146-6151, may 2015, doi: 10.1073/pnas.1502609112.
- [75] F. Basuli *et al.*, «Sortase-Mediated Site-Specific Conjugation to Prepare Fluorine-18-Labeled Nanobodies», *Bioconjug. Chem.*, ago. 2024, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.4c00264.
- [76] N. Pishesha *et al.*, «A class II MHC-targeted vaccine elicits immunity against SARS-CoV-2 and its variants», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 118, n.º 44, p. e2116147118, nov. 2021, doi: 10.1073/pnas.2116147118.
- [77] J. N. Duarte *et al.*, «Generation of Immunity against Pathogens via Single-Domain Antibody–Antigen Constructs», *J. Immunol.*, vol. 197, n.º 12, pp. 4838-4847, dic. 2016, doi: 10.4049/jimmunol.1600692.
- [78] D. Schumacher *et al.*, «Versatile and Efficient Site-Specific Protein Functionalization by Tubulin Tyrosine Ligase», *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, vol. 54, n.º 46, pp. 13787-13791, nov. 2015, doi: 10.1002/anie.201505456.
- [79] L. Hanke *et al.*, «An alpaca nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by blocking receptor interaction», *Nat. Commun.*, vol. 11, n.º 1, p. 4420, sep. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-18174-5.
- [80] L. J. Sherwood y A. Hayhurst, «Periplasmic Nanobody-APEX2 Fusions Enable Facile Visualization of Ebola, Marburg, and Mènglà virus Nucleoproteins, Alluding to Similar Antigenic Landscapes among Marburgvirus and Dianlovirus», *Viruses*, vol. 11, n.º 4, p. 364, abr. 2019, doi: 10.3390/v11040364.
- [81] U. Rothbauer, K. Zolghadr, S. Muyldermans, A. Schepers, M. C. Cardoso, y H. Leonhardt, «A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins», *Mol. Cell. Proteomics MCP*, vol. 7, n.º 2, pp. 282-289, feb. 2008, doi: 10.1074/mcp.M700342-MCP200.
- [82] J. Ashour *et al.*, «Intracellular Expression of Camelid Single-Domain Antibodies Specific for Influenza Virus Nucleoprotein Uncovers Distinct Features of Its Nuclear Localization», *J. Virol.*, vol. 89, n.º 5, pp. 2792-2800, feb. 2015, doi: 10.1128/jvi.02693-14.
- [83] J. Tome-Amat, I. Ramos, F. Amanor, A. Fernández-Sesma, y J. Ashour, «Influenza A Virus Utilizes Low-Affinity, High-Avidity Interactions with the Nuclear Import Machinery To Ensure Infection and Immune Evasion», *J. Virol.*, vol. 93, n.º 1, p. 10.1128/jvi.01046-18, dic. 2018, doi: 10.1128/jvi.01046-18.
- [84] M. Strauss, L. Schotte, K. S. Karunatilaka, D. J. Filman, y J. M. Hogle, «Cryo-electron Microscopy Structures of Expanded Poliovirus with VHHs Sample the Conformational

- Repertoire of the Expanded State», *J. Virol.*, vol. 91, n.º 3, pp. e01443-16, feb. 2017, doi: 10.1128/JVI.01443-16.
- [85] A. Fatima *et al.*, «Development of VHH antibodies against dengue virus type 2 NS1 and comparison with monoclonal antibodies for use in immunological diagnosis», *PLoS One*, vol. 9, n.º 4, p. e95263, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0095263.
- [86] S. Gelkop *et al.*, «The Development and Validation of a Novel Nanobody-Based Competitive ELISA for the Detection of Foot and Mouth Disease 3ABC Antibodies in Cattle», *Front. Vet. Sci.*, vol. 5, p. 250, oct. 2018, doi: 10.3389/fvets.2018.00250.
- [87] J. E. Pinto Torres *et al.*, «Development of a Nanobody-based lateral flow assay to detect active *Trypanosoma congolense* infections», *Sci. Rep.*, vol. 8, n.º 1, p. 9019, jun. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-26732-7.
- [88] T. Du, G. Zhu, X. Wu, J. Fang, y E.-M. Zhou, «Biotinylated Single-Domain Antibody-Based Blocking ELISA for Detection of Antibodies Against Swine Influenza Virus», *Int. J. Nanomedicine*, vol. 14, pp. 9337-9349, 2019, doi: 10.2147/IJN.S218458.
- [89] Y. Mu *et al.*, «A nanobody-horseradish peroxidase fusion protein-based competitive ELISA for rapid detection of antibodies against porcine circovirus type 2», *J. Nanobiotechnology*, vol. 19, n.º 1, p. 34, feb. 2021, doi: 10.1186/s12951-021-00778-8.
- [90] S. Y. Doerflinger *et al.*, «Development of a Nanobody-Based Lateral Flow Immunoassay for Detection of Human Norovirus», *mSphere*, vol. 1, n.º 5, p. 10.1128/msphere.00219-16, oct. 2016, doi: 10.1128/msphere.00219-16.
- [91] G. Cabral-Miranda, A. R. Cardoso, L. C. S. Ferreira, M. G. F. Sales, y M. F. Bachmann, «Biosensor-based selective detection of Zika virus specific antibodies in infected individuals», *Biosens. Bioelectron.*, vol. 113, pp. 101-107, ago. 2018, doi: 10.1016/j.bios.2018.04.058.
- [92] X. Chen *et al.*, «Synthetic nanobody-functionalized nanoparticles for accelerated development of rapid, accessible detection of viral antigens», *Biosens. Bioelectron.*, vol. 202, p. 113971, abr. 2022, doi: 10.1016/j.bios.2022.113971.
- [93] Q. Pagneux *et al.*, «SARS-CoV-2 detection using a nanobody-functionalized voltammetric device», *Commun. Med.*, vol. 2, p. 56, 2022, doi: 10.1038/s43856-022-00113-8.
- [94] Y. He *et al.*, «Development of Nanobody-Displayed Whole-Cell Biosensors for the Colorimetric Detection of SARS-CoV-2», *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 15, n.º 31, pp. 37184-37192, ago. 2023, doi: 10.1021/acsami.3c05900.
- [95] L. P. Arce *et al.*, «A multispecies competitive nanobody-based ELISA for the detection of antibodies against hepatitis E virus», *Sci. Rep.*, vol. 13, p. 15448, sep. 2023, doi: 10.1038/s41598-023-41955-z.
- [96] T. R. Wagner *et al.*, «NeutrobodyPlex-monitoring SARS-CoV-2 neutralizing immune responses using nanobodies», *EMBO Rep.*, vol. 22, n.º 5, p. e52325, may 2021, doi: 10.15252/embr.202052325.
- [97] G. C. Girt *et al.*, «The use of nanobodies in a sensitive ELISA test for SARS-CoV-2 Spike 1 protein», *R. Soc. Open Sci.*, vol. 8, n.º 9, p. 211016, sep. 2021, doi: 10.1098/rsos.211016.
- [98] M. F. Pavan *et al.*, «SARS-CoV-2 Specific Nanobodies Neutralize Different Variants of Concern and Reduce Virus Load in the Brain of h-ACE2 Transgenic Mice», *Viruses*, vol. 16, n.º 2, Art. n.º 2, feb. 2024, doi: 10.3390/v16020185.
- [99] J. Gai *et al.*, «A potent neutralizing nanobody against SARS-CoV-2 with inhaled delivery potential», *MedComm*, vol. 2, n.º 1, pp. 101-113, mar. 2021, doi: 10.1002/mco2.60.
- [100] M. Gransagne *et al.*, «Development of a highly specific and sensitive VHH-based sandwich immunoassay for the detection of the SARS-CoV-2 nucleoprotein», *J. Biol. Chem.*, vol. 298, n.º 1, ene. 2022, doi: 10.1016/j.jbc.2021.101290.
- [101] X. Chen *et al.*, «Synthetic nanobody-functionalized nanoparticles for accelerated development of rapid, accessible detection of viral antigens», *Biosens. Bioelectron.*, vol. 202, p. 113971, abr. 2022, doi: 10.1016/j.bios.2022.113971.

- [102] G. P. Anderson, J. L. Liu, T. J. Esparza, B. T. Voelker, E. R. Hofmann, y E. R. Goldman, «Single-Domain Antibodies for the Detection of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein», *Anal. Chem.*, vol. 93, n.º 19, pp. 7283-7291, may 2021, doi: 10.1021/acs.analchem.1c00677.
- [103] Z. Ma, Z. Sun, X. Lv, H. Chen, Y. Geng, y Z. Geng, «Sensitivity-enhanced nanoplasmonic biosensor using direct immobilization of two engineered nanobodies for SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain detection», *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 383, p. 133575, may 2023, doi: 10.1016/j.snb.2023.133575.
- [104] D. Wrapp *et al.*, «Structural Basis for Potent Neutralization of Betacoronaviruses by Single-Domain Camelid Antibodies», *Cell*, vol. 181, n.º 5, pp. 1004-1015.e15, may 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.04.031.
- [105] H. Saada *et al.*, «Sensing of COVID-19 spike protein in nasopharyngeal samples using a portable surface plasmon resonance diagnostic system», *Sens. Diagn.*, vol. 1, n.º 5, pp. 1021-1031, 2022, doi: 10.1039/D2SD00087C.
- [106] J. M. Casasnovas *et al.*, «Nanobodies Protecting From Lethal SARS-CoV-2 Infection Target Receptor Binding Epitopes Preserved in Virus Variants Other Than Omicron», *Front. Immunol.*, vol. 13, abr. 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.863831.
- [107] G. Ruiz-Vega *et al.*, «Rapid and direct quantification of the SARS-CoV-2 virus with an ultrasensitive nanobody-based photonic nanosensor», *Sens. Diagn.*, vol. 1, n.º 5, pp. 983-993, sep. 2022, doi: 10.1039/D2SD00082B.
- [108] L. Hannula *et al.*, «Nanobody engineering for SARS-CoV-2 neutralization and detection», *Microbiol. Spectr.*, vol. 12, n.º 4, pp. e04199-22, feb. 2024, doi: 10.1128/spectrum.04199-22.
- [109] X. Zhang, N. S. Galenkamp, N. J. van der Heide, J. Moreno, G. Maglia, y J. Kjems, «Specific Detection of Proteins by a Nanobody-Functionalized Nanopore Sensor», *ACS Nano*, vol. 17, n.º 10, pp. 9167-9177, may 2023, doi: 10.1021/acsnano.2c12733.
- [110] T. J. Esparza, N. P. Martin, G. P. Anderson, E. R. Goldman, y D. L. Brody, «High affinity nanobodies block SARS-CoV-2 spike receptor binding domain interaction with human angiotensin converting enzyme», *Sci. Rep.*, vol. 10, n.º 1, p. 22370, dic. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-79036-0.
- [111] D. P. Ghumra *et al.*, «Rapid Direct Detection of SARS-CoV-2 Aerosols in Exhaled Breath at the Point of Care», *ACS Sens.*, vol. 8, n.º 8, pp. 3023-3031, ago. 2023, doi: 10.1021/acssensors.3c00512.
- [112] K. Guo *et al.*, «Rapid single-molecule detection of COVID-19 and MERS antigens via nanobody-functionalized organic electrochemical transistors», *Nat. Biomed. Eng.*, vol. 5, n.º 7, pp. 666-677, jul. 2021, doi: 10.1038/s41551-021-00734-9.
- [113] J. Huo *et al.*, «A potent SARS-CoV-2 neutralising nanobody shows therapeutic efficacy in the Syrian golden hamster model of COVID-19», *Nat. Commun.*, vol. 12, n.º 1, p. 5469, sep. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-25480-z.
- [114] Y. Chen, W. Duan, L. Xu, G. Li, Y. Wan, y H. Li, «Nanobody-based label-free photoelectrochemical immunoassay for highly sensitive detection of SARS-CoV-2 spike protein», *Anal. Chim. Acta*, vol. 1211, p. 339904, jun. 2022, doi: 10.1016/j.aca.2022.339904.
- [115] K. S. Park, T.-I. Park, J. E. Lee, S.-Y. Hwang, A. Choi, y S. P. Pack, «Aptamers and Nanobodies as New Bioprobes for SARS-CoV-2 Diagnostic and Therapeutic System Applications», *Biosensors*, vol. 14, n.º 3, Art. n.º 3, mar. 2024, doi: 10.3390/bios14030146.
- [116] M. M. Harmsen, H. P. D. Fijten, A. Dekker, y P. L. Eblé, «Passive immunization of pigs with bispecific llama single-domain antibody fragments against foot-and-mouth disease and porcine immunoglobulin», *Vet. Microbiol.*, vol. 132, n.º 1-2, pp. 56-64, nov. 2008, doi: 10.1016/j.vetmic.2008.04.030.
- [117] A. Hultberg *et al.*, «Llama-derived single domain antibodies to build multivalent, superpotent and broadened neutralizing anti-viral molecules», *PloS One*, vol. 6, n.º 4, p. e17665, abr. 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0017665.

- [118] C. Palomo *et al.*, «Trivalency of a Nanobody Specific for the Human Respiratory Syncytial Virus Fusion Glycoprotein Drastically Enhances Virus Neutralization and Impacts Escape Mutant Selection», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 60, n.º 11, pp. 6498-6509, nov. 2016, doi: 10.1128/AAC.00842-16.
- [119] P.-A. Koenig *et al.*, «Structure-guided multivalent nanobodies block SARS-CoV-2 infection and suppress mutational escape», *Science*, vol. 371, n.º 6530, p. eabe6230, feb. 2021, doi: 10.1126/science.abe6230.
- [120] H. Ma *et al.*, «Hetero-bivalent nanobodies provide broad-spectrum protection against SARS-CoV-2 variants of concern including Omicron», *Cell Res.*, vol. 32, n.º 9, pp. 831-842, sep. 2022, doi: 10.1038/s41422-022-00700-3.
- [121] J. Yang *et al.*, «Development of a bispecific nanobody conjugate broadly neutralizes diverse SARS-CoV-2 variants and structural basis for its broad neutralization», *PLoS Pathog.*, vol. 19, n.º 11, p. e1011804, nov. 2023, doi: 10.1371/journal.ppat.1011804.
- [122] L. Garaicoechea *et al.*, «Llama-derived single-chain antibody fragments directed to rotavirus VP6 protein possess broad neutralizing activity in vitro and confer protection against diarrhea in mice», *J. Virol.*, vol. 82, n.º 19, pp. 9753-9764, oct. 2008, doi: 10.1128/JVI.00436-08.
- [123] A. Forsman *et al.*, «Llama antibody fragments with cross-subtype human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-neutralizing properties and high affinity for HIV-1 gp120», *J. Virol.*, vol. 82, n.º 24, pp. 12069-12081, dic. 2008, doi: 10.1128/JVI.01379-08.
- [124] L. E. McCoy *et al.*, «Potent and broad neutralization of HIV-1 by a llama antibody elicited by immunization», *J. Exp. Med.*, vol. 209, n.º 6, pp. 1091-1103, jun. 2012, doi: 10.1084/jem.20112655.
- [125] L. Maffey, C. G. Vega, S. Miño, L. Garaicoechea, y V. Parreño, «Anti-VP6 VHH: An Experimental Treatment for Rotavirus A-Associated Disease», *PLoS One*, vol. 11, n.º 9, p. e0162351, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0162351.
- [126] J. L. Liu, L. C. Shriver-Lake, D. Zabetakis, G. P. Anderson, y E. R. Goldman, «Selection and characterization of protective anti-chikungunya virus single domain antibodies», *Mol. Immunol.*, vol. 105, pp. 190-197, ene. 2019, doi: 10.1016/j.molimm.2018.11.016.
- [127] F. I. Schmidt *et al.*, «Phenotypic lentivirus screens to identify functional single domain antibodies», *Nat. Microbiol.*, vol. 1, n.º 8, p. 16080, jun. 2016, doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.80.
- [128] L. Hanke *et al.*, «The Antiviral Mechanism of an Influenza A Virus Nucleoprotein-Specific Single-Domain Antibody Fragment», *mBio*, vol. 7, n.º 6, pp. e01569-16, dic. 2016, doi: 10.1128/mBio.01569-16.
- [129] L. Hanke *et al.*, «Vesicular stomatitis virus N protein-specific single-domain antibody fragments inhibit replication», *EMBO Rep.*, vol. 18, n.º 6, pp. 1027-1037, jun. 2017, doi: 10.15252/embr.201643764.
- [130] E. M. Geoghegan, H. Zhang, P. J. Desai, A. Biragyn, y R. B. Markham, «Antiviral Activity of a Single-Domain Antibody Immunotoxin Binding to Glycoprotein D of Herpes Simplex Virus 2», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 59, n.º 1, pp. 527-535, dic. 2014, doi: 10.1128/aac.03818-14.
- [131] C. Cunha-Santos *et al.*, «Inhibition of HIV replication through siRNA carried by CXCR4-targeted chimeric nanobody», *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, vol. 77, n.º 14, pp. 2859-2870, jul. 2020, doi: 10.1007/s00018-019-03334-8.
- [132] A. Moliner-Morro, G. M. McNerney, y L. Hanke, «Nanobodies in the limelight: Multifunctional tools in the fight against viruses», *J. Gen. Virol.*, vol. 103, n.º 5, p. 001731, 2022, doi: 10.1099/jgv.0.001731.
- [133] L. Detalle *et al.*, «Generation and Characterization of ALX-0171, a Potent Novel Therapeutic Nanobody for the Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 60, n.º 1, pp. 6-13, ene. 2016, doi: 10.1128/AAC.01802-15.

- [134] A. Larios Mora *et al.*, «Delivery of ALX-0171 by inhalation greatly reduces respiratory syncytial virus disease in newborn lambs», *mAbs*, vol. 10, n.º 5, pp. 778-795, jul. 2018, doi: 10.1080/19420862.2018.1470727.
- [135] S. Cunningham *et al.*, «Nebulised ALX-0171 for respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection in hospitalised children: a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2b trial», *Lancet Respir. Med.*, vol. 9, n.º 1, pp. 21-32, ene. 2021, doi: 10.1016/S2213-2600(20)30320-9.
- [136] B. Schepens *et al.*, «An affinity-enhanced, broadly neutralizing heavy chain-only antibody protects against SARS-CoV-2 infection in animal models», *Sci. Transl. Med.*, vol. 13, n.º 621, p. eabi7826, nov. 2021, doi: 10.1126/scitranslmed.abi7826.
- [137] P. C. Fridy, M. P. Rout, y N. E. Ketaren, «Nanobodies: From High-Throughput Identification to Therapeutic Development», *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 23, n.º 12, p. 100865, dic. 2024, doi: 10.1016/j.mcpro.2024.100865.
- [138] E. Alexander y K. W. Leong, «Discovery of nanobodies: a comprehensive review of their applications and potential over the past five years», *J. Nanobiotechnology*, vol. 22, n.º 1, p. 661, oct. 2024, doi: 10.1186/s12951-024-02900-y.
- [139] B. Szewczyk, K. Bieńkowska-Szewczyk, y E. Król, «Introduction to molecular biology of influenza A viruses», *Acta Biochim. Pol.*, vol. 61, n.º 3, pp. 397-401, 2014.
- [140] A. V. Vasin, O. A. Temkina, V. V. Egorov, S. A. Klotchenko, M. A. Plotnikova, y O. I. Kiselev, «Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: An overview of recently discovered proteins», *Virus Res.*, vol. 185, pp. 53-63, jun. 2014, doi: 10.1016/j.virusres.2014.03.015.
- [141] X. Chen, S. Liu, M. U. Goraya, M. Maarouf, S. Huang, y J.-L. Chen, «Host Immune Response to Influenza A Virus Infection», *Front. Immunol.*, vol. 9, p. 320, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.00320.
- [142] N. M. Bouvier y P. Palese, «The biology of influenza viruses», *Vaccine*, vol. 26 Suppl 4, n.º Suppl 4, pp. D49-53, sep. 2008, doi: 10.1016/j.vaccine.2008.07.039.
- [143] T. Horimoto y Y. Kawaoka, «Pandemic threat posed by avian influenza A viruses», *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 14, n.º 1, pp. 129-149, ene. 2001, doi: 10.1128/CMR.14.1.129-149.2001.
- [144] M. W. Shaw, N. H. Arden, y H. F. Maassab, «New aspects of influenza viruses», *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 5, n.º 1, pp. 74-92, ene. 1992, doi: 10.1128/CMR.5.1.74.
- [145] U. AbuBakar, L. Amrani, F. A. Kamarulzaman, S. A. Karsani, P. Hassandarvish, y J. E. Khairat, «Avian Influenza Virus Tropism in Humans», *Viruses*, vol. 15, n.º 4, Art. n.º 4, abr. 2023, doi: 10.3390/v15040833.
- [146] E. Fodor y A. J. te Velhuis, «Structure and Function of the Influenza Virus Transcription and Replication Machinery», *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 10, n.º 9, p. a038398, sep. 2020, doi: 10.1101/cshperspect.a038398.
- [147] H. M. Wise *et al.*, «A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA», *J. Virol.*, vol. 83, n.º 16, pp. 8021-8031, ago. 2009, doi: 10.1128/JVI.00826-09.
- [148] S. A. Wharton, W. Weis, J. J. Skehel, y D. C. Wiley, «Structure, Function, and Antigenicity of the Hemagglutinin of Influenza Virus», en *The Influenza Viruses*, R. M. Krug, Ed., Boston, MA: Springer US, 1989, pp. 153-173. doi: 10.1007/978-1-4613-0811-9_3.
- [149] S. J. Gamblin y J. J. Skehel, «Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins», *J. Biol. Chem.*, vol. 285, n.º 37, pp. 28403-28409, sep. 2010, doi: 10.1074/jbc.R110.129809.
- [150] N. Sriwilaijaroen y Y. Suzuki, «Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus», *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, vol. 88, n.º 6, pp. 226-249, 2012, doi: 10.2183/pjab.88.226.

- [151] M. J. Gething, R. W. Doms, D. York, y J. White, «Studies on the mechanism of membrane fusion: site-specific mutagenesis of the hemagglutinin of influenza virus», *J. Cell Biol.*, vol. 102, n.º 1, pp. 11-23, ene. 1986, doi: 10.1083/jcb.102.1.11.
- [152] B. Isin, P. Doruker, y I. Bahar, «Functional motions of influenza virus hemagglutinin: a structure-based analytical approach», *Biophys. J.*, vol. 82, n.º 2, p. 569, feb. 2002, doi: 10.1016/S0006-3495(02)75422-2.
- [153] W. Weis, J. H. Brown, S. Cusack, J. C. Paulson, J. J. Skehel, y D. C. Wiley, «Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid», *Nature*, vol. 333, n.º 6172, pp. 426-431, jun. 1988, doi: 10.1038/333426a0.
- [154] P. N. Graves, J. L. Schulman, J. F. Young, y P. Palese, «Preparation of influenza virus subviral particles lacking the HA1 subunit of hemagglutinin: unmasking of cross-reactive HA2 determinants», *Virology*, vol. 126, n.º 1, pp. 106-116, abr. 1983, doi: 10.1016/0042-6822(83)90465-8.
- [155] Y. Wu *et al.*, «A potent broad-spectrum protective human monoclonal antibody crosslinking two haemagglutinin monomers of influenza A virus», *Nat. Commun.*, vol. 6, n.º 1, p. 7708, jul. 2015, doi: 10.1038/ncomms8708.
- [156] F. Kostolanský, K. Tomčíková, K. Briestenská, M. Mikušová, y E. Varečková, «Universal anti-influenza vaccines based on viral HA2 and M2e antigens», *Acta Virol.*, vol. 64, n.º 04, pp. 417-426, 2020, doi: 10.4149/av_2020_408.
- [157] S. Tong *et al.*, «New world bats harbor diverse influenza A viruses», *PLoS Pathog.*, vol. 9, n.º 10, p. e1003657, 2013, doi: 10.1371/journal.ppat.1003657.
- [158] R. A. Medina y A. García-Sastre, «Influenza A viruses: new research developments», *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 9, n.º 8, pp. 590-603, jul. 2011, doi: 10.1038/nrmicro2613.
- [159] A. García-Sastre, «The neuraminidase of bat influenza viruses is not a neuraminidase», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, n.º 46, p. 18635, oct. 2012, doi: 10.1073/pnas.1215857109.
- [160] R. S. Sikkema, G. S. Freidl, E. de Bruin, y M. Koopmans, «Weighing serological evidence of human exposure to animal influenza viruses - a literature review», *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.*, vol. 21, n.º 44, p. 30388, nov. 2016, doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.44.30388.
- [161] S. Vreman *et al.*, «Zoonotic Mutation of Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Virus Identified in the Brain of Multiple Wild Carnivore Species», *Pathog. Basel Switz.*, vol. 12, n.º 2, p. 168, ene. 2023, doi: 10.3390/pathogens12020168.
- [162] F. Krammer *et al.*, «Influenza», *Nat. Rev. Dis. Primer*, vol. 4, n.º 1, p. 3, jun. 2018, doi: 10.1038/s41572-018-0002-y.
- [163] T. Samji, «Influenza A: Understanding the Viral Life Cycle», *Yale J. Biol. Med.*, vol. 82, n.º 4, p. 153, dic. 2009.
- [164] T. Ito *et al.*, «Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential», *J. Virol.*, vol. 72, n.º 9, pp. 7367-7373, sep. 1998, doi: 10.1128/JVI.72.9.7367-7373.1998.
- [165] L. H. Pinto y R. A. Lamb, «The M2 proton channels of influenza A and B viruses», *J. Biol. Chem.*, vol. 281, n.º 14, pp. 8997-9000, abr. 2006, doi: 10.1074/jbc.R500020200.
- [166] J. T. Perez *et al.*, «Influenza A virus-generated small RNAs regulate the switch from transcription to replication», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, n.º 25, pp. 11525-11530, jun. 2010, doi: 10.1073/pnas.1001984107.
- [167] J. S. Rossman y R. A. Lamb, «Influenza Virus Assembly and Budding», *Virology*, vol. 411, n.º 2, p. 229, ene. 2011, doi: 10.1016/j.virol.2010.12.003.
- [168] World Health Organization, «Influenza (Seasonal)». Accedido: 4 de noviembre de 2024. [En línea]. Disponible en: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))

- [169] A. D. Iuliano *et al.*, «Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study», *The Lancet*, vol. 391, n.º 10127, pp. 1285-1300, mar. 2018, doi: 10.1016/S0140-6736(17)33293-2.
- [170] World Health Organization, «Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS)». Accedido: 4 de noviembre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.who.int/initiatives/global-influenza-surveillance-and-response-system>
- [171] P. C. Soema, R. Kompier, J.-P. Amorij, y G. F. A. Kersten, «Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies», *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV*, vol. 94, pp. 251-263, ago. 2015, doi: 10.1016/j.ejpb.2015.05.023.
- [172] M. Javanian, M. Barary, S. Ghebrehewet, V. Koppolu, V. Vasigala, y S. Ebrahimpour, «A brief review of influenza virus infection», *J. Med. Virol.*, vol. 93, n.º 8, pp. 4638-4646, 2021, doi: 10.1002/jmv.26990.
- [173] E. Król, M. Rychłowska, y B. Szewczyk, «Antivirals--current trends in fighting influenza», *Acta Biochim. Pol.*, vol. 61, n.º 3, pp. 495-504, 2014.
- [174] H.-L. Yen, «Current and novel antiviral strategies for influenza infection», *Curr. Opin. Virol.*, vol. 18, pp. 126-134, jun. 2016, doi: 10.1016/j.coviro.2016.05.004.
- [175] K. E. Ng, «Xofluza (Baloxavir Marboxil) for the Treatment Of Acute Uncomplicated Influenza», *Pharm. Ther.*, vol. 44, n.º 1, p. 9, ene. 2019.
- [176] J. L. McKimm-Breschkin, «Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance», *Influenza Other Respir. Viruses*, vol. 7 Suppl 1, n.º Suppl 1, pp. 25-36, ene. 2013, doi: 10.1111/irv.12047.
- [177] J. Shi, X. Zeng, P. Cui, C. Yan, y H. Chen, «Alarming situation of emerging H5 and H7 avian influenza and effective control strategies», *Emerg. Microbes Infect.*, vol. 12, n.º 1, p. 2155072, dic. 2022, doi: 10.1080/22221751.2022.2155072.
- [178] J. H. Verhagen, R. A. M. Fouchier, y N. Lewis, «Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses at the Wild–Domestic Bird Interface in Europe: Future Directions for Research and Surveillance», *Viruses*, vol. 13, n.º 2, Art. n.º 2, feb. 2021, doi: 10.3390/v13020212.
- [179] M. S. França y J. D. Brown, «Influenza pathobiology and pathogenesis in avian species», *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 385, pp. 221-242, 2014, doi: 10.1007/82_2014_385.
- [180] M. Worobey *et al.*, «Preliminary report on genomic epidemiology of the 2024 H5N1 influenza A virus outbreak in U.S. cattle (Part 1 of 2)», may 2024. Accedido: 3 de septiembre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://virological.org/t/preliminary-report-on-genomic-epidemiology-of-the-2024-h5n1-influenza-a-virus-outbreak-in-u-s-cattle-part-1-of-2/970>
- [181] World Health Organization, «Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003-2024, 26 February 2024». Accedido: 4 de noviembre de 2024. [En línea]. Disponible en: [https://www.who.int/publications/m/item/cumulative-number-of-confirmed-human-cases-for-avian-influenza-a\(h5n1\)-reported-to-who--2003-2024-26-february-2024](https://www.who.int/publications/m/item/cumulative-number-of-confirmed-human-cases-for-avian-influenza-a(h5n1)-reported-to-who--2003-2024-26-february-2024)
- [182] T. K. Anderson *et al.*, «Swine Influenza A Viruses and the Tangled Relationship with Humans», *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 11, n.º 3, p. a038737, ene. 2021, doi: 10.1101/cshperspect.a038737.
- [183] E. Petro-Turnquist, M. J. Pekarek, y E. A. Weaver, «Swine influenza A virus: challenges and novel vaccine strategies», *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 14, abr. 2024, doi: 10.3389/fcimb.2024.1336013.
- [184] D. C. A. Moraes *et al.*, «Veterinarian perceptions and practices in prevention and control of influenza virus in the Midwest United States swine farms», *Front. Vet. Sci.*, vol. 10, p. 1089132, 2023, doi: 10.3389/fvets.2023.1089132.
- [185] Y. Li y I. Robertson, «The epidemiology of swine influenza», *Anim. Dis.*, vol. 1, n.º 1, p. 21, sep. 2021, doi: 10.1186/s44149-021-00024-6.

- [186] G. J. D. Smith *et al.*, «Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic», *Nature*, vol. 459, n.º 7250, pp. 1122-1125, jun. 2009, doi: 10.1038/nature08182.
- [187] S. E. Hufton, P. Risley, C. R. Ball, D. Major, O. G. Engelhardt, y S. Poole, «The Breadth of Cross Sub-Type Neutralisation Activity of a Single Domain Antibody to Influenza Hemagglutinin Can Be Increased by Antibody Valency», *PLoS ONE*, vol. 9, n.º 8, p. e103294, ago. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0103294.
- [188] C. Dreyfus *et al.*, «Highly Conserved Protective Epitopes on Influenza B Viruses», *Science*, vol. 337, n.º 6100, p. 1343, ago. 2012, doi: 10.1126/science.1222908.
- [189] D. J. Benton *et al.*, «Influenza hemagglutinin membrane anchor», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 115, n.º 40, p. 10112, sep. 2018, doi: 10.1073/pnas.1810927115.
- [190] L. Zhu *et al.*, «Inhibition of Influenza A Virus (H1N1) Fusion by Benzenesulfonamide Derivatives Targeting Viral Hemagglutinin», *PLoS ONE*, vol. 6, n.º 12, p. e29120, dic. 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0029120.
- [191] T.-J. Lin, C.-F. Lin, C.-H. Chiu, M.-C. Lee, y J.-T. Horng, «Inhibition of endosomal fusion activity of influenza virus by Rheum tanguticum (da-huang)», *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 27768, jun. 2016, doi: 10.1038/srep27768.
- [192] N. S. Laursen y I. A. Wilson, «Broadly neutralizing antibodies against influenza viruses», *Antiviral Res.*, vol. 98, n.º 3, pp. 476-483, jun. 2013, doi: 10.1016/j.antiviral.2013.03.021.
- [193] D. Corti *et al.*, «A Neutralizing Antibody Selected from Plasma Cells That Binds to Group 1 and Group 2 Influenza A Hemagglutinins», *Science*, vol. 333, n.º 6044, pp. 850-856, ago. 2011, doi: 10.1126/science.1205669.
- [194] D. C. Ekiert *et al.*, «A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses», *Science*, vol. 333, n.º 6044, pp. 843-850, ago. 2011, doi: 10.1126/science.1204839.
- [195] W. Wang *et al.*, «Human antibody 3E1 targets the HA stem region of H1N1 and H5N6 influenza A viruses», *Nat. Commun.*, vol. 7, n.º 1, p. 13577, dic. 2016, doi: 10.1038/ncomms13577.
- [196] N. L. Kallewaard *et al.*, «Structure and Function Analysis of an Antibody Recognizing All Influenza A Subtypes», *Cell*, vol. 166, n.º 3, pp. 596-608, jul. 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.05.073.
- [197] S. Günther-Ausborn, A. Praetor, y T. Stegmann, «Inhibition of Influenza-induced Membrane Fusion by Lysophosphatidylcholine (*)», *J. Biol. Chem.*, vol. 270, n.º 49, pp. 29279-29285, dic. 1995, doi: 10.1074/jbc.270.49.29279.
- [198] L. Gui y K. K. Lee, «Influenza Virus-Liposome Fusion Studies Using Fluorescence Dequenching and Cryo-electron Tomography», *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 1836, pp. 261-279, 2018, doi: 10.1007/978-1-4939-8678-1_13.
- [199] World Health Organization, «Una sola salud». Accedido: 6 de noviembre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/one-health>
- [200] R. Lu *et al.*, «Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding», *The Lancet*, vol. 395, n.º 10224, pp. 565-574, feb. 2020, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
- [201] D. Gupta, P. Sharma, M. Singh, M. Kumar, A. S. Ethayathulla, y P. Kaur, «Structural and functional insights into the spike protein mutations of emerging SARS-CoV-2 variants», *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 78, n.º 24, pp. 7967-7989, dic. 2021, doi: 10.1007/s00018-021-04008-0.
- [202] A. Wu *et al.*, «Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China», *Cell Host Microbe*, vol. 27, n.º 3, pp. 325-328, mar. 2020, doi: 10.1016/j.chom.2020.02.001.
- [203] Y. Chen, Q. Liu, y D. Guo, «Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis», *J. Med. Virol.*, vol. 92, n.º 10, p. 2249, oct. 2020, doi: 10.1002/jmv.26234.

- [204] N. Redondo, S. Zaldívar-López, J. J. Garrido, y M. Montoya, «SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns», *Front. Immunol.*, vol. 12, p. 708264, 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.708264.
- [205] L. Mousavizadeh y S. Ghasemi, «Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis», *J. Microbiol. Immunol. Infect. Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*, vol. 54, n.º 2, pp. 159-163, abr. 2021, doi: 10.1016/j.jmii.2020.03.022.
- [206] A. C. Walls, Y.-J. Park, M. A. Tortorici, A. Wall, A. T. McGuire, y D. Veasley, «Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein», *Cell*, vol. 181, n.º 2, pp. 281-292.e6, abr. 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
- [207] F. Wu *et al.*, «A new coronavirus associated with human respiratory disease in China», *Nature*, vol. 579, n.º 7798, pp. 265-269, mar. 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2008-3.
- [208] H. A. M. Hussein *et al.*, «SARS-CoV-2 outbreak: role of viral proteins and genomic diversity in virus infection and COVID-19 progression», *Virology*, vol. 21, n.º 1, p. 75, mar. 2024, doi: 10.1186/s12985-024-02342-w.
- [209] D. Wrapp *et al.*, «Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation», *Science*, vol. 367, n.º 6483, pp. 1260-1263, mar. 2020, doi: 10.1126/science.abb2507.
- [210] M. Hoffmann *et al.*, «SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor», *Cell*, vol. 181, n.º 2, pp. 271-280.e8, abr. 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
- [211] J. Beumer *et al.*, «A CRISPR/Cas9 genetically engineered organoid biobank reveals essential host factors for coronaviruses», *Nat. Commun.*, vol. 12, n.º 1, p. 5498, sep. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-25729-7.
- [212] Z. Daniloski *et al.*, «Identification of Required Host Factors for SARS-CoV-2 Infection in Human Cells», *Cell*, vol. 184, n.º 1, pp. 92-105.e16, ene. 2021, doi: 10.1016/j.cell.2020.10.030.
- [213] J. Wei *et al.*, «Genome-wide CRISPR Screens Reveal Host Factors Critical for SARS-CoV-2 Infection», *Cell*, vol. 184, n.º 1, pp. 76-91.e13, ene. 2021, doi: 10.1016/j.cell.2020.10.028.
- [214] H. Yang y Z. Rao, «Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development», *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 19, n.º 11, pp. 685-700, nov. 2021, doi: 10.1038/s41579-021-00630-8.
- [215] Q. Wang *et al.*, «Structural Basis for RNA Replication by the SARS-CoV-2 Polymerase», *Cell*, vol. 182, n.º 2, pp. 417-428.e13, jul. 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.05.034.
- [216] P. V'kovski, A. Kratzel, S. Steiner, H. Stalder, y V. Thiel, «Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2», *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 19, n.º 3, pp. 155-170, mar. 2021, doi: 10.1038/s41579-020-00468-6.
- [217] B. Malone, N. Urakova, E. J. Snijder, y E. A. Campbell, «Structures and functions of coronavirus replication-transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design», *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 23, n.º 1, pp. 21-39, ene. 2022, doi: 10.1038/s41580-021-00432-z.
- [218] L. Mendonça *et al.*, «Correlative multi-scale cryo-imaging unveils SARS-CoV-2 assembly and egress», *Nat. Commun.*, vol. 12, n.º 1, p. 4629, jul. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-24887-y.
- [219] C. Drosten *et al.*, «Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome», *N. Engl. J. Med.*, vol. 348, n.º 20, pp. 1967-1976, may 2003, doi: 10.1056/NEJMoa030747.
- [220] A. M. Zaki, S. van Boheemen, T. M. Bestebroer, A. D. M. E. Osterhaus, y R. A. M. Fouchier, «Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia», *N. Engl. J. Med.*, vol. 367, n.º 19, pp. 1814-1820, nov. 2012, doi: 10.1056/NEJMoa1211721.
- [221] K. McIntosh, J. H. Dees, W. B. Becker, A. Z. Kapikian, y R. M. Chanock, «Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 57, n.º 4, pp. 933-940, abr. 1967, doi: 10.1073/pnas.57.4.933.

- [222] N. Zhu *et al.*, «A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019», *N. Engl. J. Med.*, vol. 382, n.º 8, pp. 727-733, feb. 2020, doi: 10.1056/NEJMoa2001017.
- [223] A. Rambaut *et al.*, «A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology», *Nat. Microbiol.*, vol. 5, n.º 11, pp. 1403-1407, nov. 2020, doi: 10.1038/s41564-020-0770-5.
- [224] B. Korber *et al.*, «Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus», *Cell*, vol. 182, n.º 4, pp. 812-827.e19, ago. 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.06.043.
- [225] M. Becerra-Flores y T. Cardozo, «SARS-CoV-2 viral spike G614 mutation exhibits higher case fatality rate», *Int. J. Clin. Pract.*, vol. 74, n.º 8, p. e13525, 2020, doi: 10.1111/ijcp.13525.
- [226] A. C. Chrysostomou, The COMESSAR Network, y L. G. Kostrikis, «Into the Cauldron of the Variant Soup: Insights into the Molecular Epidemiology and Transition to Endemicity of SARS-CoV-2 in Cyprus (November 2022–February 2024)», *Viruses*, vol. 16, n.º 11, Art. n.º 11, nov. 2024, doi: 10.3390/v16111686.
- [227] S. E. Galloway *et al.*, «Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Lineage - United States, December 29, 2020-January 12, 2021», *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, vol. 70, n.º 3, pp. 95-99, ene. 2021, doi: 10.15585/mmwr.mm7003e2.
- [228] H. Tegally *et al.*, «Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa», *Nature*, vol. 592, n.º 7854, pp. 438-443, abr. 2021, doi: 10.1038/s41586-021-03402-9.
- [229] N. R. Faria *et al.*, «Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil», *Science*, vol. 372, n.º 6544, pp. 815-821, may 2021, doi: 10.1126/science.abh2644.
- [230] S. Cherian *et al.*, «SARS-CoV-2 Spike Mutations, L452R, T478K, E484Q and P681R, in the Second Wave of COVID-19 in Maharashtra, India», *Microorganisms*, vol. 9, n.º 7, p. 1542, jul. 2021, doi: 10.3390/microorganisms9071542.
- [231] E. Callaway, «Heavily mutated Omicron variant puts scientists on alert», *Nature*, vol. 600, n.º 7887, pp. 21-21, nov. 2021, doi: 10.1038/d41586-021-03552-w.
- [232] R. K. Mohapatra *et al.*, «The recently emerged BA.4 and BA.5 lineages of Omicron and their global health concerns amid the ongoing wave of COVID-19 pandemic - Correspondence», *Int. J. Surg. Lond. Engl.*, vol. 103, p. 106698, jul. 2022, doi: 10.1016/j.ijsu.2022.106698.
- [233] Y. Fan, X. Li, L. Zhang, S. Wan, L. Zhang, y F. Zhou, «SARS-CoV-2 Omicron variant: recent progress and future perspectives», *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 7, n.º 1, p. 141, abr. 2022, doi: 10.1038/s41392-022-00997-x.
- [234] H. Brüssow, «COVID-19: Omicron - the latest, the least virulent, but probably not the last variant of concern of SARS-CoV-2», *Microb. Biotechnol.*, vol. 15, n.º 7, pp. 1927-1939, jul. 2022, doi: 10.1111/1751-7915.14064.
- [235] E. Callaway, «What Omicron's BA.4 and BA.5 variants mean for the pandemic», *Nature*, vol. 606, n.º 7916, pp. 848-849, jun. 2022, doi: 10.1038/d41586-022-01730-y.
- [236] K. Dhama *et al.*, «Global emerging Omicron variant of SARS-CoV-2: Impacts, challenges and strategies», *J. Infect. Public Health*, vol. 16, n.º 1, pp. 4-14, ene. 2023, doi: 10.1016/j.jiph.2022.11.024.
- [237] W. Liu, Z. Huang, J. Xiao, Y. Wu, N. Xia, y Q. Yuan, «Evolution of the SARS-CoV-2 Omicron Variants: Genetic Impact on Viral Fitness», *Viruses*, vol. 16, n.º 2, p. 184, ene. 2024, doi: 10.3390/v16020184.
- [238] C. Kurhade *et al.*, «Low neutralization of SARS-CoV-2 Omicron BA.2.75.2, BQ.1.1 and XBB.1 by parental mRNA vaccine or a BA.5 bivalent booster», *Nat. Med.*, vol. 29, n.º 2, pp. 344-347, feb. 2023, doi: 10.1038/s41591-022-02162-x.
- [239] World Health Organization, «Statement on the fifteenth meeting of the IHR (2005) Emergency Committee on the COVID-19 pandemic». Accedido: 10 de noviembre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on->

- the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-(covid-19)-pandemic
- [240] World Health Organization, «From emergency response to long-term COVID-19 disease management: sustaining gains made during the COVID-19 pandemic», 2023.
- [241] S. P. Otto, A. MacPherson, y C. Colijn, «Endemic does not mean constant as SARS-CoV-2 continues to evolve», *Evol. Int. J. Org. Evol.*, vol. 78, n.º 6, pp. 1092-1108, may 2024, doi: 10.1093/evolut/qpae041.
- [242] World Health Organization, «Tracking SARS-CoV-2 variants». Accedido: 10 de noviembre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>
- [243] M.-Y. Wang, R. Zhao, L.-J. Gao, X.-F. Gao, D.-P. Wang, y J.-M. Cao, «SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development», *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 10, nov. 2020, doi: 10.3389/fcimb.2020.587269.
- [244] Y. Xu *et al.*, «Characteristics of pediatric SARS-CoV-2 infection and potential evidence for persistent fecal viral shedding», *Nat. Med.*, vol. 26, n.º 4, pp. 502-505, abr. 2020, doi: 10.1038/s41591-020-0817-4.
- [245] M. Meselson, «Droplets and Aerosols in the Transmission of SARS-CoV-2», *N. Engl. J. Med.*, vol. 382, n.º 21, p. 2063, may 2020, doi: 10.1056/NEJMc2009324.
- [246] R. Sommerstein *et al.*, «Risk of SARS-CoV-2 transmission by aerosols, the rational use of masks, and protection of healthcare workers from COVID-19», *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, vol. 9, n.º 1, p. 100, jul. 2020, doi: 10.1186/s13756-020-00763-0.
- [247] M. M. Lamers y B. L. Haagmans, «SARS-CoV-2 pathogenesis», *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 20, n.º 5, pp. 270-284, may 2022, doi: 10.1038/s41579-022-00713-0.
- [248] S. A. Lauer *et al.*, «The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application», *Ann. Intern. Med.*, vol. 172, n.º 9, pp. 577-582, may 2020, doi: 10.7326/M20-0504.
- [249] Q. Li *et al.*, «Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia», *N. Engl. J. Med.*, vol. 382, n.º 13, pp. 1199-1207, mar. 2020, doi: 10.1056/NEJMoa2001316.
- [250] C. Eastin y T. Eastin, «Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China», *J. Emerg. Med.*, vol. 58, n.º 4, pp. 711-712, abr. 2020, doi: 10.1016/j.jemermed.2020.04.004.
- [251] C. Huang *et al.*, «Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China», *Lancet Lond. Engl.*, vol. 395, n.º 10223, pp. 497-506, feb. 2020, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
- [252] N. Chen *et al.*, «Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study», *Lancet Lond. Engl.*, vol. 395, n.º 10223, pp. 507-513, feb. 2020, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
- [253] D. Wang *et al.*, «Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China», *JAMA*, vol. 323, n.º 11, pp. 1061-1069, mar. 2020, doi: 10.1001/jama.2020.1585.
- [254] ARDS Definition Task Force *et al.*, «Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition», *JAMA*, vol. 307, n.º 23, pp. 2526-2533, jun. 2012, doi: 10.1001/jama.2012.5669.
- [255] K. J. Goh *et al.*, «Rapid Progression to Acute Respiratory Distress Syndrome: Review of Current Understanding of Critical Illness from Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Infection», *Ann. Acad. Med. Singapore*, vol. 49, n.º 3, pp. 108-118, mar. 2020.
- [256] D. A. Berlin, R. M. Gulick, y F. J. Martinez, «Severe Covid-19», *N. Engl. J. Med.*, vol. 383, n.º 25, pp. 2451-2460, dic. 2020, doi: 10.1056/NEJMcp2009575.
- [257] M. O'Driscoll *et al.*, «Age-specific mortality and immunity patterns of SARS-CoV-2», *Nature*, vol. 590, n.º 7844, pp. 140-145, feb. 2021, doi: 10.1038/s41586-020-2918-0.

- [258] C. Karagiannidis *et al.*, «Case characteristics, resource use, and outcomes of 10 021 patients with COVID-19 admitted to 920 German hospitals: an observational study», *Lancet Respir. Med.*, vol. 8, n.º 9, pp. 853-862, sep. 2020, doi: 10.1016/S2213-2600(20)30316-7.
- [259] Y. Liu, X. Gu, H. Li, H. Zhang, y J. Xu, «Mechanisms of long COVID: An updated review», *Chin. Med. J. Pulm. Crit. Care Med.*, vol. 1, n.º 4, pp. 231-240, dic. 2023, doi: 10.1016/j.pccm.2023.10.003.
- [260] T. Greenhalgh, M. Sivan, A. Perlowski, y J. Ž. Nikolich, «Long COVID: a clinical update», *The Lancet*, vol. 404, n.º 10453, pp. 707-724, ago. 2024, doi: 10.1016/S0140-6736(24)01136-X.
- [261] M. Cascella, M. Rajnik, A. Aleem, S. C. Dulebohn, y R. Di Napoli, «Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19)», en *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024. Accedido: 10 de noviembre de 2024. [En línea]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>
- [262] D. Focosi, M. Franchini, F. Maggi, y S. Shoham, «COVID-19 therapeutics», *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 37, n.º 2, pp. e00119-23, may 2024, doi: 10.1128/cmr.00119-23.
- [263] T. K. Warren *et al.*, «Therapeutic efficacy of the small molecule GS-5734 against Ebola virus in rhesus monkeys», *Nature*, vol. 531, n.º 7594, pp. 381-385, mar. 2016, doi: 10.1038/nature17180.
- [264] T. P. Sheahan *et al.*, «Broad-spectrum antiviral GS-5734 inhibits both epidemic and zoonotic coronaviruses», *Sci. Transl. Med.*, vol. 9, n.º 396, p. eaal3653, jun. 2017, doi: 10.1126/scitranslmed.aal3653.
- [265] G. R. Painter, M. G. Natchus, O. Cohen, W. Holman, y W. P. Painter, «Developing a direct acting, orally available antiviral agent in a pandemic: the evolution of molnupiravir as a potential treatment for COVID-19», *Curr. Opin. Virol.*, vol. 50, pp. 17-22, oct. 2021, doi: 10.1016/j.coviro.2021.06.003.
- [266] R. P. Joyce, V. W. Hu, y J. Wang, «The history, mechanism, and perspectives of nirmatrelvir (PF-07321332): an orally bioavailable main protease inhibitor used in combination with ritonavir to reduce COVID-19-related hospitalizations», *Med. Chem. Res.*, vol. 31, n.º 10, p. 1637, ago. 2022, doi: 10.1007/s00044-022-02951-6.
- [267] D. Focosi, M. Tuccori, y M. Franchini, «The Road towards Polyclonal Anti-SARS-CoV-2 Immunoglobulins (Hyperimmune Serum) for Passive Immunization in COVID-19», *Life Basel Switz.*, vol. 11, n.º 2, p. 144, feb. 2021, doi: 10.3390/life11020144.
- [268] J. W. Senefeld *et al.*, «Use of convalescent plasma in COVID-19 patients with immunosuppression», *Transfusion (Paris)*, vol. 61, n.º 8, pp. 2503-2511, ago. 2021, doi: 10.1111/trf.16525.
- [269] A. A. R. Tobian, C. S. Cohn, y B. H. Shaz, «COVID-19 convalescent plasma», *Blood*, vol. 140, n.º 3, p. 196, jul. 2022, doi: 10.1182/blood.2021012248.
- [270] B. Kelley, P. De Moor, K. Douglas, T. Renshaw, y S. Traviglia, «Monoclonal antibody therapies for COVID-19: lessons learned and implications for the development of future products», *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 78, p. 102798, dic. 2022, doi: 10.1016/j.copbio.2022.102798.
- [271] M. Dougan *et al.*, «Bamlanivimab plus Etesevimab in Mild or Moderate Covid-19», *N. Engl. J. Med.*, vol. 385, n.º 15, pp. 1382-1392, oct. 2021, doi: 10.1056/NEJMoa2102685.
- [272] ACTIV-3–Therapeutics for Inpatients with COVID-19 (TICO) Study Group, «Tixagevimab-cilgavimab for treatment of patients hospitalised with COVID-19: a randomised, double-blind, phase 3 trial», *Lancet Respir. Med.*, vol. 10, n.º 10, pp. 972-984, oct. 2022, doi: 10.1016/S2213-2600(22)00215-6.
- [273] ACTIV-3/Therapeutics for Inpatients with COVID-19 (TICO) Study Group, «Efficacy and safety of two neutralising monoclonal antibody therapies, sotrovimab and BRII-196 plus BRII-198, for adults hospitalised with COVID-19 (TICO): a randomised controlled trial»,

- Lancet Infect. Dis.*, vol. 22, n.º 5, pp. 622-635, may 2022, doi: 10.1016/S1473-3099(21)00751-9.
- [274] M. Cox *et al.*, «SARS-CoV-2 variant evasion of monoclonal antibodies based on in vitro studies», *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 21, n.º 2, pp. 112-124, feb. 2023, doi: 10.1038/s41579-022-00809-7.
- [275] J. Xu *et al.*, «Nanobodies from camelid mice and llamas neutralize SARS-CoV-2 variants», *Nature*, vol. 595, n.º 7866, pp. 278-282, jul. 2021, doi: 10.1038/s41586-021-03676-z.
- [276] M. Li *et al.*, «Broadly neutralizing and protective nanobodies against SARS-CoV-2 Omicron subvariants BA.1, BA.2, and BA.4/5 and diverse sarbecoviruses», *Nat. Commun.*, vol. 13, n.º 1, p. 7957, dic. 2022, doi: 10.1038/s41467-022-35642-2.
- [277] Z. Sun *et al.*, «Structure basis of two nanobodies neutralizing SARS-CoV-2 Omicron variant by targeting ultra-conservative epitopes», *J. Struct. Biol.*, vol. 215, n.º 3, p. 107996, sep. 2023, doi: 10.1016/j.jsb.2023.107996.
- [278] A. Moulana *et al.*, «The landscape of antibody binding affinity in SARS-CoV-2 Omicron BA.1 evolution», *eLife*, vol. 12, p. e83442, feb. 2023, doi: 10.7554/eLife.83442.
- [279] T. R. Wagner *et al.*, «Biparatopic nanobodies protect mice from lethal challenge with SARS-CoV-2 variants of concern», *EMBO Rep.*, vol. 23, n.º 2, p. e53865, feb. 2022, doi: 10.15252/embr.202153865.
- [280] L. Misson Mindrebo *et al.*, «Fully synthetic platform to rapidly generate tetravalent bispecific nanobody-based immunoglobulins», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 120, n.º 24, p. e2216612120, jun. 2023, doi: 10.1073/pnas.2216612120.
- [281] D. Dormeshkin *et al.*, «Isolation of an escape-resistant SARS-CoV-2 neutralizing nanobody from a novel synthetic nanobody library», *Front. Immunol.*, vol. 13, p. 965446, 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.965446.
- [282] W. Zeng *et al.*, «An engineered bispecific nanobody in tetrameric secretory IgA format confers broad neutralization against SARS-CoV-1&2 and most variants», *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 253, n.º Pt 3, p. 126817, dic. 2023, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.126817.
- [283] S. A. Hollingsworth *et al.*, «Discovery and multimerization of cross-reactive single-domain antibodies against SARS-like viruses to enhance potency and address emerging SARS-CoV-2 variants», *Sci. Rep.*, vol. 13, n.º 1, p. 13668, ago. 2023, doi: 10.1038/s41598-023-40919-7.
- [284] M. A. Rossotti *et al.*, «Arsenal of nanobodies shows broad-spectrum neutralization against SARS-CoV-2 variants of concern in vitro and in vivo in hamster models», *Commun. Biol.*, vol. 5, n.º 1, p. 933, sep. 2022, doi: 10.1038/s42003-022-03866-z.
- [285] F. Amanat *et al.*, «A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans», *Nat. Med.*, vol. 26, n.º 7, p. 1033, may 2020, doi: 10.1038/s41591-020-0913-5.
- [286] A. Rosa *et al.*, «SARS-CoV-2 can recruit a heme metabolite to evade antibody immunity», *Sci. Adv.*, vol. 7, n.º 22, p. eabg7607, may 2021, doi: 10.1126/sciadv.abg7607.
- [287] C. Motozono *et al.*, «SARS-CoV-2 spike L452R variant evades cellular immunity and increases infectivity», *Cell Host Microbe*, vol. 29, n.º 7, pp. 1124-1136.e11, jul. 2021, doi: 10.1016/j.chom.2021.06.006.
- [288] D. B. Naidoo y A. A. Chuturgoon, «The Potential of Nanobodies for COVID-19 Diagnostics and Therapeutics», *Mol. Diagn. Ther.*, vol. 27, n.º 2, pp. 193-226, mar. 2023, doi: 10.1007/s40291-022-00634-x.
- [289] G. Valenzuela-Nieto *et al.*, «Nanobodies: COVID-19 and Future Perspectives», *Front. Drug Discov.*, vol. 2, jul. 2022, doi: 10.3389/fddsv.2022.927164.
- [290] I. A. Favorskaya *et al.*, «Single-Domain Antibodies Efficiently Neutralize SARS-CoV-2 Variants of Concern», *Front. Immunol.*, vol. 13, p. 822159, 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.822159.
- [291] H. Ma *et al.*, «A bispecific nanobody dimer broadly neutralizes SARS-CoV-1 & 2 variants of concern and offers substantial protection against Omicron via low-dose intranasal

- administration», *Cell Discov.*, vol. 8, n.º 1, p. 132, dic. 2022, doi: 10.1038/s41421-022-00497-w.
- [292] M. Aksu *et al.*, «Nanobodies to multiple spike variants and inhalation of nanobody-containing aerosols neutralize SARS-CoV-2 in cell culture and hamsters», *Antiviral Res.*, vol. 221, p. 105778, ene. 2024, doi: 10.1016/j.antiviral.2023.105778.
- [293] I. Jovčevska y S. Muyldermans, «The Therapeutic Potential of Nanobodies», *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.*, vol. 34, n.º 1, pp. 11-26, feb. 2020, doi: 10.1007/s40259-019-00392-z.
- [294] Y. Xiang *et al.*, «Superimmunity by pan-sarbecovirus nanobodies», *Cell Rep.*, vol. 39, n.º 13, p. 111004, jun. 2022, doi: 10.1016/j.celrep.2022.111004.
- [295] O. C. Grant, D. Montgomery, K. Ito, y R. J. Woods, «Analysis of the SARS-CoV-2 spike protein glycan shield reveals implications for immune recognition», *Sci. Rep.*, vol. 10, n.º 1, p. 14991, sep. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-71748-7.
- [296] F. D. Mast *et al.*, «Highly synergistic combinations of nanobodies that target SARS-CoV-2 and are resistant to escape», *eLife*, vol. 10, p. e73027, dic. 2021, doi: 10.7554/eLife.73027.
- [297] E. Hodcroft, «CoVariants». Accedido: 11 de noviembre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://covariants.org/>
- [298] A. J. Kombe Kombe, A. Zahid, A. Mohammed, R. Shi, y T. Jin, «Potent Molecular Feature-based Neutralizing Monoclonal Antibodies as Promising Therapeutics Against SARS-CoV-2 Infection», *Front. Mol. Biosci.*, vol. 8, p. 670815, 2021, doi: 10.3389/fmolb.2021.670815.
- [299] H. A. Elshabrawy, M. M. Coughlin, S. C. Baker, y B. S. Prabhakar, «Human monoclonal antibodies against highly conserved HR1 and HR2 domains of the SARS-CoV spike protein are more broadly neutralizing», *PloS One*, vol. 7, n.º 11, p. e50366, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0050366.
- [300] X. Ou *et al.*, «Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV», *Nat. Commun.*, vol. 11, n.º 1, p. 1620, mar. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-15562-9.
- [301] D. Gupta *et al.*, «Effect of Double Mutation (L452R and E484Q) on the Binding Affinity of Monoclonal Antibodies (mAbs) against the RBD-A Target for Vaccine Development», *Vaccines*, vol. 11, n.º 1, p. 23, dic. 2022, doi: 10.3390/vaccines11010023.
- [302] P.-A. Koenig *et al.*, «Structure-guided multivalent nanobodies block SARS-CoV-2 infection and suppress mutational escape», *Science*, vol. 371, n.º 6530, p. eabe6230, feb. 2021, doi: 10.1126/science.abe6230.
- [303] D. Zhao *et al.*, «A potent synthetic nanobody with broad-spectrum activity neutralizes SARS-CoV-2 virus and the Omicron variant BA.1 through a unique binding mode», *J. Nanobiotechnology*, vol. 20, n.º 1, p. 411, sep. 2022, doi: 10.1186/s12951-022-01619-y.
- [304] Y. Xiang *et al.*, «Versatile and multivalent nanobodies efficiently neutralize SARS-CoV-2», *Science*, vol. 370, n.º 6523, pp. 1479-1484, dic. 2020, doi: 10.1126/science.abe4747.
- [305] J. Dong *et al.*, «Development of humanized tri-specific nanobodies with potent neutralization for SARS-CoV-2», *Sci. Rep.*, vol. 10, n.º 1, p. 17806, oct. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-74761-y.
- [306] T. Güttler *et al.*, «Neutralization of SARS-CoV-2 by highly potent, hyperthermostable, and mutation-tolerant nanobodies», *EMBO J.*, vol. 40, n.º 19, p. e107985, oct. 2021, doi: 10.15252/embj.2021107985.
- [307] M. G. Guzman, D. J. Gubler, A. Izquierdo, E. Martinez, y S. B. Halstead, «Dengue infection», *Nat. Rev. Dis. Primer*, vol. 2, p. 16055, ago. 2016, doi: 10.1038/nrdp.2016.55.
- [308] T. J. Chambers, C. S. Hahn, R. Galler, y C. M. Rice, «Flavivirus genome organization, expression, and replication», *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 44, pp. 649-688, 1990, doi: 10.1146/annurev.mi.44.100190.003245.

- [309] S. Mukhopadhyay, R. J. Kuhn, y M. G. Rossmann, «A structural perspective of the flavivirus life cycle», *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 3, n.º 1, pp. 13-22, ene. 2005, doi: 10.1038/nrmicro1067.
- [310] Q. Zeng, J. Liu, C. Hao, B. Zhang, y H. Zhang, «Making sense of flavivirus non-structural protein 1 in innate immune evasion and inducing tissue-specific damage», *Virus Res.*, vol. 336, p. 199222, oct. 2023, doi: 10.1016/j.virusres.2023.199222.
- [311] S. Payne, «Family *Flaviviridae*», en *Viruses*, S. Payne, Ed., Academic Press, 2017, pp. 129-139. doi: 10.1016/B978-0-12-803109-4.00015-5.
- [312] I.-M. Yu *et al.*, «Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation», *Science*, vol. 319, n.º 5871, pp. 1834-1837, mar. 2008, doi: 10.1126/science.1153264.
- [313] S. Elshuber, S. L. Allison, F. X. Heinz, y C. W. Mandl, «Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus», *J. Gen. Virol.*, vol. 84, n.º Pt 1, pp. 183-191, ene. 2003, doi: 10.1099/vir.0.18723-0.
- [314] L. A. Byk y A. V. Gamarnik, «Properties and Functions of the Dengue Virus Capsid Protein», *Annu. Rev. Virol.*, vol. 3, n.º 1, pp. 263-281, sep. 2016, doi: 10.1146/annurev-virology-110615-042334.
- [315] V. D. Dwivedi, I. P. Tripathi, R. C. Tripathi, S. Bharadwaj, y S. K. Mishra, «Genomics, proteomics and evolution of dengue virus», *Brief. Funct. Genomics*, vol. 16, n.º 4, pp. 217-227, jul. 2017, doi: 10.1093/bfpg/elw040.
- [316] J. M. Mackenzie, M. K. Jones, y P. R. Young, «Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication», *Virology*, vol. 220, n.º 1, pp. 232-240, jun. 1996, doi: 10.1006/viro.1996.0307.
- [317] D. A. Muller y P. R. Young, «The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker», *Antiviral Res.*, vol. 98, n.º 2, pp. 192-208, may 2013, doi: 10.1016/j.antiviral.2013.03.008.
- [318] E. Fang *et al.*, «NS1 Protein N-Linked Glycosylation Site Affects the Virulence and Pathogenesis of Dengue Virus», *Vaccines*, vol. 11, n.º 5, p. 959, may 2023, doi: 10.3390/vaccines11050959.
- [319] Y. Nie, D. Deng, L. Mou, Q. Long, J. Chen, y J. Wu, «Dengue Virus 2 NS2B Targets MAVS and IKKε to Evade the Antiviral Innate Immune Response», *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 33, n.º 5, pp. 600-606, may 2023, doi: 10.4014/jmb.2210.10006.
- [320] R. Yusof, S. Clum, M. Wetzell, H. M. K. Murthy, y R. Padmanabhan, «Purified NS2B/NS3 Serine Protease of Dengue Virus Type 2 Exhibits Cofactor NS2B Dependence for Cleavage of Substrates with Dibasic Amino Acids *in Vitro**», *J. Biol. Chem.*, vol. 275, n.º 14, pp. 9963-9969, abr. 2000, doi: 10.1074/jbc.275.14.9963.
- [321] S. Clum, K. E. Ebner, y R. Padmanabhan, «Cotranslational Membrane Insertion of the Serine Proteinase Precursor NS2B-NS3(Pro) of Dengue Virus Type 2 Is Required for Efficient *in Vitro* Processing and Is Mediated through the Hydrophobic Regions of NS2B*», *J. Biol. Chem.*, vol. 272, n.º 49, pp. 30715-30723, dic. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.49.30715.
- [322] D. Leung *et al.*, «Activity of Recombinant Dengue 2 Virus NS3 Protease in the Presence of a Truncated NS2B Co-factor, Small Peptide Substrates, and Inhibitors*», *J. Biol. Chem.*, vol. 276, n.º 49, pp. 45762-45771, dic. 2001, doi: 10.1074/jbc.M107360200.
- [323] T. Xu *et al.*, «Structure of the Dengue Virus Helicase/Nucleoside Triphosphatase Catalytic Domain at a Resolution of 2.4 Å», *J. Virol.*, vol. 79, n.º 16, pp. 10278-10288, ago. 2005, doi: 10.1128/jvi.79.16.10278-10288.2005.
- [324] Y.-F. Hung, M. Schwarten, S. Hoffmann, D. Willbold, E. H. Sklan, y B. W. Koenig, «Amino Terminal Region of Dengue Virus NS4A Cytosolic Domain Binds to Highly Curved Liposomes», *Viruses*, vol. 7, n.º 7, Art. n.º 7, jul. 2015, doi: 10.3390/v7072812.
- [325] J. Zou *et al.*, «Characterization of Dengue Virus NS4A and NS4B Protein Interaction», *J. Virol.*, vol. 89, n.º 7, pp. 3455-3470, mar. 2015, doi: 10.1128/jvi.03453-14.

- [326] S. Miller, S. Kastner, J. Krijnse-Locker, S. Bühler, y R. Bartenschlager, «The Non-structural Protein 4A of Dengue Virus Is an Integral Membrane Protein Inducing Membrane Alterations in a 2K-regulated Manner*», *J. Biol. Chem.*, vol. 282, n.º 12, pp. 8873-8882, mar. 2007, doi: 10.1074/jbc.M609919200.
- [327] P. Klaitong y D. R. Smith, «Roles of Non-Structural Protein 4A in Flavivirus Infection», *Viruses*, vol. 13, n.º 10, Art. n.º 10, oct. 2021, doi: 10.3390/v13102077.
- [328] A. Płaszczycza *et al.*, «A novel interaction between dengue virus nonstructural protein 1 and the NS4A-2K-4B precursor is required for viral RNA replication but not for formation of the membranous replication organelle», *PLOS Pathog.*, vol. 15, n.º 5, p. e1007736, may 2019, doi: 10.1371/journal.ppat.1007736.
- [329] J. Zou *et al.*, «Mapping the Interactions between the NS4B and NS3 Proteins of Dengue Virus», *J. Virol.*, vol. 89, n.º 7, pp. 3471-3483, mar. 2015, doi: 10.1128/jvi.03454-14.
- [330] H. Lu *et al.*, «Novel insights into the function of an N-terminal region of DENV2 NS4B for the optimal helicase activity of NS3», *Virus Res.*, vol. 295, p. 198318, abr. 2021, doi: 10.1016/j.virusres.2021.198318.
- [331] J. L. Muñoz-Jordán, G. G. Sánchez-Burgos, M. Laurent-Rolle, y A. García-Sastre, «Inhibition of interferon signaling by dengue virus», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, n.º 24, pp. 14333-14338, nov. 2003, doi: 10.1073/pnas.2335168100.
- [332] A. El Sahili y J. Lescar, «Dengue Virus Non-Structural Protein 5», *Viruses*, vol. 9, n.º 4, p. 91, abr. 2017, doi: 10.3390/v9040091.
- [333] S.-W. Wan, B. A. Wu-Hsieh, Y.-S. Lin, W.-Y. Chen, Y. Huang, y R. Anderson, «The monocyte-macrophage-mast cell axis in dengue pathogenesis», *J. Biomed. Sci.*, vol. 25, n.º 1, p. 77, nov. 2018, doi: 10.1186/s12929-018-0482-9.
- [334] S. B. Halstead y E. J. O'Rourke, «Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody», *J. Exp. Med.*, vol. 146, n.º 1, pp. 201-217, jul. 1977, doi: 10.1084/jem.146.1.201.
- [335] A. P. Durbin *et al.*, «Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever», *Virology*, vol. 376, n.º 2, pp. 429-435, jul. 2008, doi: 10.1016/j.virol.2008.03.028.
- [336] C. Cruz-Oliveira, J. M. Freire, T. M. Conceição, L. M. Higa, M. A. R. B. Castanho, y A. T. Da Poian, «Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells», *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 39, n.º 2, pp. 155-170, mar. 2015, doi: 10.1093/femsre/fuu004.
- [337] T. O. Vega-Almeida, M. Salas-Benito, M. A. De Nova-Ocampo, R. M. Del Angel, y J. S. Salas-Benito, «Surface proteins of C6/36 cells involved in dengue virus 4 binding and entry», *Arch. Virol.*, vol. 158, n.º 6, pp. 1189-1207, jun. 2013, doi: 10.1007/s00705-012-1596-0.
- [338] J. S. Salas-Benito y R. M. del Angel, «Identification of two surface proteins from C6/36 cells that bind dengue type 4 virus», *J. Virol.*, vol. 71, n.º 10, pp. 7246-7252, oct. 1997, doi: 10.1128/JVI.71.10.7246-7252.1997.
- [339] J. L. Miller *et al.*, «The Mannose Receptor Mediates Dengue Virus Infection of Macrophages», *PLOS Pathog.*, vol. 4, n.º 2, p. e17, feb. 2008, doi: 10.1371/journal.ppat.0040017.
- [340] B. Tassaneetrithep *et al.*, «DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells», *J. Exp. Med.*, vol. 197, n.º 7, pp. 823-829, abr. 2003, doi: 10.1084/jem.20021840.
- [341] H. M. van der Schaar *et al.*, «Dissecting the Cell Entry Pathway of Dengue Virus by Single-Particle Tracking in Living Cells», *PLOS Pathog.*, vol. 4, n.º 12, p. e1000244, dic. 2008, doi: 10.1371/journal.ppat.1000244.
- [342] E. G. Acosta, V. Castilla, y E. B. Damonte, «Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells», *Cell. Microbiol.*, vol. 11, n.º 10, pp. 1533-1549, oct. 2009, doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01345.x.

- [343] T. C. Pierson y M. S. Diamond, «Degrees of maturity: the complex structure and biology of flaviviruses», *Curr. Opin. Virol.*, vol. 2, n.º 2, pp. 168-175, abr. 2012, doi: 10.1016/j.coviro.2012.02.011.
- [344] Y. Modis, S. Ogata, D. Clements, y S. C. Harrison, «Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion», *Nature*, vol. 427, n.º 6972, pp. 313-319, ene. 2004, doi: 10.1038/nature02165.
- [345] Y. Zhang *et al.*, «Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein», *Struct. Lond. Engl.* 1993, vol. 12, n.º 9, pp. 1607-1618, sep. 2004, doi: 10.1016/j.str.2004.06.019.
- [346] L. Markoff, «In vitro processing of dengue virus structural proteins: cleavage of the pre-membrane protein», *J. Virol.*, vol. 63, n.º 8, pp. 3345-3352, ago. 1989, doi: 10.1128/JVI.63.8.3345-3352.1989.
- [347] S. M. Amberg y C. M. Rice, «Mutagenesis of the NS2B-NS3-mediated cleavage site in the flavivirus capsid protein demonstrates a requirement for coordinated processing», *J. Virol.*, vol. 73, n.º 10, pp. 8083-8094, oct. 1999, doi: 10.1128/JVI.73.10.8083-8094.1999.
- [348] S. Welsch *et al.*, «Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites», *Cell Host Microbe*, vol. 5, n.º 4, pp. 365-375, abr. 2009, doi: 10.1016/j.chom.2009.03.007.
- [349] G. Lk, H. A, M. G, y M. Jm, «The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex», *J. Virol.*, vol. 84, n.º 20, oct. 2010, doi: 10.1128/JVI.00986-10.
- [350] K. Hodge, C. Tunghirun, M. Kamkaew, T. Limjindaporn, P. Yenchitsomanus, y S. Chimnarong, «Identification of a Conserved RNA-dependent RNA Polymerase (RdRp)-RNA Interface Required for Flaviviral Replication *», *J. Biol. Chem.*, vol. 291, n.º 33, pp. 17437-17449, ago. 2016, doi: 10.1074/jbc.M116.724013.
- [351] K. Stadler, S. L. Allison, J. Schlich, y F. X. Heinz, «Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin», *J. Virol.*, vol. 71, n.º 11, pp. 8475-8481, nov. 1997, doi: 10.1128/JVI.71.11.8475-8481.1997.
- [352] S. Mukherjee *et al.*, «Enhancing dengue virus maturation using a stable furin over-expressing cell line», *Virology*, vol. 497, pp. 33-40, oct. 2016, doi: 10.1016/j.virol.2016.06.022.
- [353] D. J. Gubler, «Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status», *Novartis Found. Symp.*, vol. 277, pp. 3-16; discussion 16-22, 71-73, 251-253, 2006, doi: 10.1002/0470058005.ch2.
- [354] D. J. Gubler y G. G. Clark, «Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: The Emergence of a Global Health Problem», *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 1, n.º 2, pp. 55-57, jun. 1995, doi: 10.3201/eid0102.952004.
- [355] N. Vasilakis y S. C. Weaver, «The history and evolution of human dengue emergence», *Adv. Virus Res.*, vol. 72, pp. 1-76, 2008, doi: 10.1016/S0065-3527(08)00401-6.
- [356] B. Zerfu, T. Kassa, y M. Legesse, «Epidemiology, biology, pathogenesis, clinical manifestations, and diagnosis of dengue virus infection, and its trend in Ethiopia: a comprehensive literature review», *Trop. Med. Health*, vol. 51, n.º 1, p. 11, feb. 2023, doi: 10.1186/s41182-023-00504-0.
- [357] E. Togami *et al.*, «Epidemiology of dengue reported in the World Health Organization's Western Pacific Region, 2013–2019», *West. Pac. Surveill. Response J. WPSAR*, vol. 14, n.º 1, pp. 1-16, mar. 2023, doi: 10.5365/wpsar.2023.14.1.973.
- [358] World Health Organization, «Dengue guidelines, for diagnosis, treatment, prevention and control». 2009. Accedido: 24 de octubre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241547871>
- [359] World Health Organization, «Dengue and severe dengue». Accedido: 4 de octubre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>

- [360] European Centre for Disease Prevention and Control, «Dengue worldwide overview». Accedido: 7 de octubre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/dengue-monthly>
- [361] Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud, «Informe de la situación epidemiológica del dengue en las Américas», 37, oct. 2024. Accedido: 7 de octubre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/informe-situacion-no-37-situacion-epidemiologica-dengue-americas-semana-epidemiologica>
- [362] O. J. Brady *et al.*, «Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus», *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 6, n.º 8, p. e1760, 2012, doi: 10.1371/journal.pntd.0001760.
- [363] H. Harapan *et al.*, «Dengue viruses circulating in Indonesia: A systematic review and phylogenetic analysis of data from five decades», *Rev. Med. Virol.*, vol. 29, n.º 4, p. e2037, jul. 2019, doi: 10.1002/rmv.2037.
- [364] M. S. López *et al.*, «Dengue emergence in the temperate Argentinian province of Santa Fe, 2009–2020», *Sci. Data*, vol. 8, n.º 1, p. 134, may 2021, doi: 10.1038/s41597-021-00914-x.
- [365] Ministerio de Salud de la República Argentina, «Boletín Epidemiológico Nacional N°715, SE 30», 715, ago. 2024. Accedido: 21 de octubre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/boletin-epidemiologico-nacional/boletines-2024>
- [366] A. Bolzan *et al.*, «Dinámica y caracterización epidemiológica del brote de dengue en Argentina año 2016: el caso de la Provincia de Buenos Aires», *Rev. Chil. Infectol.*, vol. 36, n.º 1, pp. 16-25, feb. 2019, doi: 10.4067/S0716-10182019000100016.
- [367] Ministerio de Salud de la República Argentina, «Boletín Integrado de Vigilancia N°320, SE 30», 320, jul. 2016. Accedido: 21 de octubre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/boletin-integrado-de-vigilancia-n320-se30.pdf>
- [368] Ministerio de Salud de la República Argentina, «Boletín Epidemiológico Nacional N°663, SE30», 633, ago. 2023. Accedido: 24 de octubre de 2024. [En línea]. Disponible en: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/2024/04/ben_663_se_30.pdf
- [369] C. P. Simmons, J. J. Farrar, N. van V. Chau, y B. Wills, «Dengue», *N. Engl. J. Med.*, vol. 366, n.º 15, pp. 1423-1432, abr. 2012, doi: 10.1056/NEJMra1110265.
- [370] D. R. Glasner, H. Puerta-Guardo, P. R. Beatty, y E. Harris, «The Good, the Bad, and the Shocking: The Multiple Roles of Dengue Virus Nonstructural Protein 1 in Protection and Pathogenesis», *Annu. Rev. Virol.*, vol. 5, n.º Volume 5, 2018, pp. 227-253, sep. 2018, doi: 10.1146/annurev-virology-101416-041848.
- [371] A. Wilder-Smith, E.-E. Ooi, O. Horstick, y B. Wills, «Dengue», *The Lancet*, vol. 393, n.º 10169, pp. 350-363, ene. 2019, doi: 10.1016/S0140-6736(18)32560-1.
- [372] N. Alexander *et al.*, «Multicentre prospective study on dengue classification in four South-east Asian and three Latin American countries», *Trop. Med. Int. Health*, vol. 16, n.º 8, pp. 936-948, 2011, doi: 10.1111/j.1365-3156.2011.02793.x.
- [373] G. Paz-Bailey, L. E. Adams, J. Deen, K. B. Anderson, y L. C. Katzelnick, «Dengue», *The Lancet*, vol. 403, n.º 10427, pp. 667-682, feb. 2024, doi: 10.1016/S0140-6736(23)02576-X.
- [374] C. Ghetia, P. Bhatt, y C. Mukhopadhyay, «Association of dengue virus non-structural-1 protein with disease severity: a brief review», *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 116, n.º 11, pp. 986-995, nov. 2022, doi: 10.1093/trstmh/trac087.
- [375] H. Puerta-Guardo, D. R. Glasner, y E. Harris, «Dengue Virus NS1 Disrupts the Endothelial Glycocalyx, Leading to Hyperpermeability», *PLOS Pathog.*, vol. 12, n.º 7, p. e1005738, jul. 2016, doi: 10.1371/journal.ppat.1005738.
- [376] N. Modhiran *et al.*, «Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity», *Sci. Transl. Med.*, vol. 7, n.º 304, pp. 304ra142-304ra142, sep. 2015, doi: 10.1126/scitranslmed.aaa3863.

- [377] P. Avirutnan *et al.*, «Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1», *J. Exp. Med.*, vol. 207, n.º 4, pp. 793-806, abr. 2010, doi: 10.1084/jem.20092545.
- [378] P. Avirutnan, R. E. Hauhart, P. Somnuk, A. M. Blom, M. S. Diamond, y J. P. Atkinson, «Binding of Flavivirus Nonstructural Protein NS1 to C4b Binding Protein Modulates Complement Activation», *J. Immunol.*, vol. 187, n.º 1, pp. 424-433, jul. 2011, doi: 10.4049/jimmunol.1100750.
- [379] J. N. Conde *et al.*, «Inhibition of the Membrane Attack Complex by Dengue Virus NS1 through Interaction with Vitronectin and Terminal Complement Proteins», *J. Virol.*, vol. 90, n.º 21, pp. 9570-9581, oct. 2016, doi: 10.1128/jvi.00912-16.
- [380] D. M. Carvalho *et al.*, «Elevated Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Serum Levels and Altered Toll-Like Receptor 4 Expression, Nitric Oxide, and Tumor Necrosis Factor Alpha Production in Dengue Hemorrhagic Fever Patients», *J. Trop. Med.*, vol. 2014, p. 901276, dic. 2014, doi: 10.1155/2014/901276.
- [381] R. Thayan *et al.*, «The use of two-dimension electrophoresis to identify serum biomarkers from patients with dengue haemorrhagic fever», *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 103, n.º 4, pp. 413-419, abr. 2009, doi: 10.1016/j.trstmh.2008.12.018.
- [382] S. A. Paranaivitane *et al.*, «Dengue NS1 antigen as a marker of severe clinical disease», *BMC Infect. Dis.*, vol. 14, n.º 1, p. 570, oct. 2014, doi: 10.1186/s12879-014-0570-8.
- [383] P. Avirutnan *et al.*, «Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement», *J. Infect. Dis.*, vol. 193, n.º 8, pp. 1078-1088, abr. 2006, doi: 10.1086/500949.
- [384] Organización Panamericana de la Salud, «Dengue: guías para la atención de enfermos en la Región de las Américas.» 2016. Accedido: 25 de octubre de 2024. [En línea]. Disponible en: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/28232/9789275318904_esp.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- [385] CDC, «Clinical Testing Guidance for Dengue», Dengue. Accedido: 25 de octubre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dengue/hcp/diagnosis-testing/index.html>
- [386] S. Alcon, A. Talarmin, M. Debruyne, A. Falconar, V. Deubel, y M. Flamand, «Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections», *J. Clin. Microbiol.*, vol. 40, n.º 2, pp. 376-381, feb. 2002, doi: 10.1128/JCM.40.02.376-381.2002.
- [387] D. H. Libraty *et al.*, «High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever», *J. Infect. Dis.*, vol. 186, n.º 8, pp. 1165-1168, oct. 2002, doi: 10.1086/343813.
- [388] P. R. Young, P. A. Hilditch, C. Bletchly, y W. Halloran, «An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients», *J. Clin. Microbiol.*, vol. 38, n.º 3, pp. 1053-1057, mar. 2000, doi: 10.1128/JCM.38.3.1053-1057.2000.
- [389] V. Tricou, N. N. Minh, J. Farrar, H. T. Tran, y C. P. Simmons, «Kinetics of viremia and NS1 antigenemia are shaped by immune status and virus serotype in adults with dengue», *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 5, n.º 9, p. e1309, sep. 2011, doi: 10.1371/journal.pntd.0001309.
- [390] S. Matheus *et al.*, «Specificity of Dengue NS1 Antigen in Differential Diagnosis of Dengue and Zika Virus Infection», *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 22, n.º 9, p. 1691, sep. 2016, doi: 10.3201/eid2209.160725.
- [391] L. K. Tan *et al.*, «Flavivirus Cross-Reactivity to Dengue Nonstructural Protein 1 Antigen Detection Assays», *Diagnostics*, vol. 10, n.º 1, p. 11, dic. 2019, doi: 10.3390/diagnostics10010011.

- [392] R. Fisher, Y. Lustig, E. H. Sklan, y E. Schwartz, «The Role of NS1 Protein in the Diagnosis of Flavivirus Infections», *Viruses*, vol. 15, n.º 2, p. 572, feb. 2023, doi: 10.3390/v15020572.
- [393] L. Osorio, M. Ramirez, A. Bonelo, L. A. Villar, y B. Parra, «Comparison of the diagnostic accuracy of commercial NS1-based diagnostic tests for early dengue infection», *Viol. J.*, vol. 7, p. 361, dic. 2010, doi: 10.1186/1743-422X-7-361.
- [394] D. W. Vaughn *et al.*, «Dengue in the early febrile phase: viremia and antibody responses», *J. Infect. Dis.*, vol. 176, n.º 2, pp. 322-330, ago. 1997, doi: 10.1086/514048.
- [395] P. Koraka *et al.*, «Detection of immune-complex-dissociated nonstructural-1 antigen in patients with acute dengue virus infections», *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, n.º 9, pp. 4154-4159, sep. 2003, doi: 10.1128/JCM.41.9.4154-4159.2003.
- [396] M. Flamand, F. Megret, M. Mathieu, J. Lepault, F. A. Rey, y V. Deubel, «Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion», *J. Virol.*, vol. 73, n.º 7, pp. 6104-6110, jul. 1999, doi: 10.1128/JVI.73.7.6104-6110.1999.
- [397] S. Alcon, A. Talarmin, M. Debruyne, A. Falconar, V. Deubel, y M. Flamand, «Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections», *J. Clin. Microbiol.*, vol. 40, n.º 2, pp. 376-381, feb. 2002, doi: 10.1128/JCM.40.02.376-381.2002.
- [398] N. Hitoshi, Y. Ken-ichi, y M. Jun-ichi, «Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector», *Gene*, vol. 108, n.º 2, pp. 193-199, dic. 1991, doi: 10.1016/0378-1119(91)90434-D.
- [399] B. Shu *et al.*, «CryoEM structures of the multimeric secreted NS1, a major factor for dengue hemorrhagic fever», *Nat. Commun.*, vol. 13, n.º 1, p. 6756, nov. 2022, doi: 10.1038/s41467-022-34415-1.
- [400] Q. Pan *et al.*, «The step-by-step assembly mechanism of secreted flavivirus NS1 tetramer and hexamer captured at atomic resolution», *Sci. Adv.*, vol. 10, n.º 18, p. eadm8275, may 2024, doi: 10.1126/sciadv.adm8275.
- [401] X. Qiang *et al.*, «Discovery of a polystyrene binding peptide isolated from phage display library and its application in peptide immobilization», *Sci. Rep.*, vol. 7, n.º 1, p. 2673, jun. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-02891-x.
- [402] E. M. Obeng, D. L. Steer, A. J. Fulcher, y K. M. Wagstaff, «Sortase A transpeptidation produces seamless, unbranched biotinylated nanobodies for multivalent and multifunctional applications», *Nanoscale Adv.*, vol. 5, n.º 8, p. 2251, mar. 2023, doi: 10.1039/d3na00014a.
- [403] M. Rossotti, S. Tabares, L. Alfaya, C. Leizagoyen, G. Moron, y G. González-Sapienza, «Streamlined method for parallel identification of single domain antibodies to membrane receptors on whole cells», *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1850, n.º 7, p. 1397, mar. 2015, doi: 10.1016/j.bbagen.2015.03.009.
- [404] M. da R. Q. Lima *et al.*, «A simple heat dissociation method increases significantly the ELISA detection sensitivity of the nonstructural-1 glycoprotein in patients infected with DENV type-4», *J. Virol. Methods*, vol. 204, pp. 105-108, ago. 2014, doi: 10.1016/j.jviromet.2014.02.031.
- [405] W.-F. Shen, J. U. Galula, G.-J. J. Chang, H.-C. Wu, C.-C. King, y D.-Y. Chao, «Improving dengue viral antigens detection in dengue patient serum specimens using a low pH glycine buffer treatment», *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, vol. 50, n.º 2, pp. 167-174, abr. 2017, doi: 10.1016/j.jmii.2015.05.008.
- [406] S. N. Buonora *et al.*, «Increased sensitivity of NS1 ELISA by heat dissociation in acute dengue 4 cases», *BMC Infect. Dis.*, vol. 17, n.º 1, p. 204, mar. 2017, doi: 10.1186/s12879-017-2306-z.

- [407] J. A. Ayukekbong, O. G. Oyero, S. E. Nnukwu, H. N. Mesumbe, y C. N. Fobisong, «Value of routine dengue diagnosis in endemic countries», *World J. Virol.*, vol. 6, n.º 1, p. 9, feb. 2017, doi: 10.5501/wjv.v6.i1.9.
- [408] Y. Takebe *et al.*, «SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat», *Mol. Cell. Biol.*, vol. 8, n.º 1, pp. 466-472, ene. 1988, doi: 10.1128/mcb.8.1.466-472.1988.
- [409] K. Rozen-Gagnon, N. J. Moreland, C. Ruedl, y S. G. Vasudevan, «Expression and immunoaffinity purification of recombinant dengue virus 2 NS1 protein as a cleavable SUMOstar fusion», *Protein Expr. Purif.*, vol. 82, n.º 1, pp. 20-25, mar. 2012, doi: 10.1016/j.pep.2011.11.003.
- [410] D. Allonso, I. B. Pereira, A. M. Alves, E. Kurtenbach, y R. Mohana-Borges, «Expression of soluble, glycosylated and correctly folded dengue virus NS1 protein in *Pichia pastoris*», *Protein Expr. Purif.*, vol. 162, pp. 9-17, oct. 2019, doi: 10.1016/j.pep.2019.05.003.
- [411] M. F. Xisto, J. W. O. Prates, I. M. Dias, R. S. Dias, C. C. da Silva, y S. O. de Paula, «NS1 Recombinant Proteins Are Efficiently Produced in *Pichia pastoris* and Have Great Potential for Use in Diagnostic Kits for Dengue Virus Infections», *Diagn. Basel Switz.*, vol. 10, n.º 6, p. 379, jun. 2020, doi: 10.3390/diagnostics10060379.
- [412] M. Singh, H. Sori, R. Ahuja, J. Meena, D. Sehgal, y A. K. Panda, «Effect of N-terminal poly histidine-tag on immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae* surface protein SP0845», *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 163, pp. 1240-1248, nov. 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.056.
- [413] «pFUSE Collection», InvivoGen. Accedido: 12 de noviembre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.invivogen.com/pfuse>
- [414] C. M. Malnero *et al.*, «Expression of recombinant dengue virus type 1 non-structural protein 1 in mammalian cells and preliminary assessment of its suitability to detect human IgG antibodies elicited by viral infection», *J. Immunol. Methods*, vol. 518, p. 113503, jul. 2023, doi: 10.1016/j.jim.2023.113503.
- [415] Q. Su, W. Shi, X. Huang, S. Yin, X. Yang, y X. Lu, «Recent advances of nanobody applications in diagnosis and detection», doi: 10.1002/mba2.54.
- [416] T. Delfin-Riela, M. Rossotti, R. Alvez-Rosado, C. Leizagoyen, y G. González-Sapienza, «Highly Sensitive Detection of Zika Virus Nonstructural Protein 1 in Serum Samples by a Two-Site Nanobody ELISA», *Biomolecules*, vol. 10, n.º 12, p. 1652, dic. 2020, doi: 10.3390/biom10121652.
- [417] Q. Lu *et al.*, «Nanobody-horseradish peroxidase and -EGFP fusions as reagents to detect porcine parvovirus in the immunoassays», *J. Nanobiotechnology*, vol. 18, n.º 1, p. 7, ene. 2020, doi: 10.1186/s12951-019-0568-x.
- [418] C. G. Vega *et al.*, «ROTADIAL: The first nanobody-based immunoassay to detect Group A Rotavirus», *J. Virol. Methods*, vol. 298, p. 114279, dic. 2021, doi: 10.1016/j.jviromet.2021.114279.
- [419] G. Llauger *et al.*, «Development of Nanobodies against Mal de Río Cuarto virus major viroplasm protein P9-1 for diagnostic sandwich ELISA and immunodetection», *Sci. Rep.*, vol. 11, n.º 1, p. 20013, oct. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-99275-z.
- [420] A. Schlör *et al.*, «SARS-CoV-2 neutralizing camelid heavy-chain-only antibodies as powerful tools for diagnostic and therapeutic applications», *Front. Immunol.*, vol. 13, p. 930975, 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.930975.
- [421] Q. Li *et al.*, «Highly potent multivalent VHH antibodies against Chikungunya isolated from an alpaca naïve phage display library», *J. Nanobiotechnology*, vol. 20, n.º 1, p. 231, may 2022, doi: 10.1186/s12951-022-01417-6.
- [422] C. Y. Cheung *et al.*, «Development of an ELISA-Based Potency Assay for Inactivated Influenza Vaccines Using Cross-Reactive Nanobodies», *Vaccines*, vol. 10, n.º 9, Art. n.º 9, sep. 2022, doi: 10.3390/vaccines10091473.

- [423] F. J. Morales-Yanez, I. Sariego, C. Vincke, G. Hassanzadeh-Ghassabeh, K. Polman, y S. Muyldermans, «An innovative approach in the detection of *Toxocara canis* excretory/secretory antigens using specific nanobodies», *Int. J. Parasitol.*, vol. 49, n.º 8, pp. 635-645, jul. 2019, doi: 10.1016/j.ijpara.2019.03.004.
- [424] R. Pandolfi, D. R. de Almeida, M. A. Pinto, L. C. Kreutz, y R. Frandoloso, «In house ELISA based on recombinant ORF2 protein underline high prevalence of IgG anti-hepatitis E virus amongst blood donors in south Brazil», *PLOS ONE*, vol. 12, n.º 5, p. e0176409, may 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0176409.
- [425] S. Lilyanna *et al.*, «Variability in Microplate Surface Properties and Its Impact on ELISA», *J. Appl. Lab. Med.*, vol. 2, n.º 5, pp. 687-699, mar. 2018, doi: 10.1373/jalm.2017.023952.
- [426] Thermo Fischer Scientific, «Blocking Buffers for Western Blot and ELISA - AR». Accedido: 13 de noviembre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/ar/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/blocking-buffers-western-blot-elisa.html>
- [427] L. Rambozzi, A. Menzano, S. Lavin, y L. Rossi, «Biotin-avidin amplified ELISA for detection of antibodies to *Sarcoptes scabiei* in chamois (*Rupicapra* spp.)», *Vet. Res.*, vol. 35, n.º 6, pp. 701-708, 2004, doi: 10.1051/vetres:2004039.
- [428] M. R. Wilson y S. B. Easterbrook-Smith, «Enzyme complex amplification--a signal amplification method for use in enzyme immunoassays», *Anal. Biochem.*, vol. 209, n.º 1, pp. 183-187, feb. 1993, doi: 10.1006/abio.1993.1100.
- [429] Thermo Fischer Scientific, «Factors Affecting Signal Generation in ELISA - AR». Accedido: 13 de noviembre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/ar/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa/factors-affecting-ELISA-signal.html>
- [430] C. A. Ascoli y B. Aggeler, «Overlooked Benefits of using Polyclonal Antibodies», *BioTechniques*, sep. 2018, doi: 10.2144/btn-2018-0065.
- [431] F. Liu *et al.*, «Immunization with DNA prime-subunit protein boost strategy based on influenza H9N2 virus conserved matrix protein M1 and its epitope screening», *Sci. Rep.*, vol. 10, n.º 1, p. 4144, mar. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-60783-z.
- [432] H. Li, S. Wang, G. Hu, L. Zhang, S. Liu, y S. Lu, «DNA priming immunization is more effective than recombinant protein vaccine in eliciting antigen-specific B cell responses», *Emerg. Microbes Infect.*, vol. 10, n.º 1, pp. 833-841, dic. 2021, doi: 10.1080/22221751.2021.1918026.
- [433] Y. Wang *et al.*, «Orf virus DNA prime-protein boost strategy is superior to adenovirus-based vaccination in mice and sheep», *Front. Immunol.*, vol. 14, mar. 2023, doi: 10.3389/fimmu.2023.1077938.
- [434] L. Zhu, J. He, X. Cao, K. Huang, Y. Luo, y W. Xu, «Development of a double-antibody sandwich ELISA for rapid detection of *Bacillus Cereus* in food», *Sci. Rep.*, vol. 6, n.º 1, p. 16092, mar. 2016, doi: 10.1038/srep16092.
- [435] S. Liu *et al.*, «Purification of a polyclonal antibody against CD147 for ELISA using antigen-immunoaffinity chromatography», *Mol. Med. Rep.*, vol. 15, n.º 6, pp. 4035-4040, jun. 2017, doi: 10.3892/mmr.2017.6523.
- [436] S. Luo *et al.*, «Production and identification of monoclonal antibodies and development of a sandwich ELISA for detection of the H3-subtype avian influenza virus antigen», *AMB Express*, vol. 10, n.º 1, p. 49, mar. 2020, doi: 10.1186/s13568-020-00988-7.
- [437] S. Mallick *et al.*, «Production and characterization of monoclonal antibodies against foot-and-mouth disease virus serotype O and development of a sandwich ELISA for virus antigen detection», *Vet. Res. Commun.*, vol. 47, n.º 4, pp. 1915-1924, dic. 2023, doi: 10.1007/s11259-023-10143-9.

- [438] D. Chen *et al.*, «Characterization and Double-Antibody Sandwich ELISA Application of a Monoclonal Antibody Against Akabane Virus Nucleocapsid Protein», *J. AOAC Int.*, vol. 106, n.º 4, pp. 931-938, ago. 2023, doi: 10.1093/jaoacint/qsad025.
- [439] K. Lapphra *et al.*, «Evaluation of an NS1 antigen detection for diagnosis of acute dengue infection in patients with acute febrile illness», *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 60, n.º 4, pp. 387-391, abr. 2008, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.11.010.
- [440] W. J. H. McBride, «Evaluation of dengue NS1 test kits for the diagnosis of dengue fever», *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 64, n.º 1, pp. 31-36, may 2009, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.01.002.
- [441] S. Pal *et al.*, «Evaluation of dengue NS1 antigen rapid tests and ELISA kits using clinical samples», *PloS One*, vol. 9, n.º 11, p. e113411, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0113411.
- [442] M. Mladenovic Stokanic *et al.*, «Sandwich ELISA for the Quantification of Nucleocapsid Protein of SARS-CoV-2 Based on Polyclonal Antibodies from Two Different Species», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 25, n.º 1, Art. n.º 1, ene. 2024, doi: 10.3390/ijms25010333.
- [443] A. B. Byrne *et al.*, «Epidemiological and clinical features of the 2016–2018 Zika virus outbreak in northern Argentina», *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 117, n.º 8, pp. 561-568, ago. 2023, doi: 10.1093/trstmh/trad013.
- [444] E. Romão, V. Poignavent, C. Vincke, C. Ritzenthaler, S. Muyldermans, y B. Monsion, «Construction of High-Quality Camel Immune Antibody Libraries», en *Phage Display: Methods and Protocols*, M. Hust y T. S. Lim, Eds., New York, NY: Springer, 2018, pp. 169-187. doi: 10.1007/978-1-4939-7447-4_9.
- [445] A. Poulain, S. Perret, F. Malenfant, A. Mullick, B. Massie, y Y. Durocher, «Rapid protein production from stable CHO cell pools using plasmid vector and the cumate gene-switch», *J. Biotechnol.*, vol. 255, pp. 16-27, ago. 2017, doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.06.009.
- [446] Argentinian AntiCovid Consortium, «Structural and functional comparison of SARS-CoV-2-spike receptor binding domain produced in *Pichia pastoris* and mammalian cells | Scientific Reports», dic. 2020, Accedido: 15 de noviembre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-78711-6>
- [447] F. Ferrara y N. Temperton, «Pseudotype Neutralization Assays: From Laboratory Bench to Data Analysis», *Methods Protoc.*, vol. 1, n.º 1, Art. n.º 1, mar. 2018, doi: 10.3390/mps1010008.
- [448] Y. Zhu, D. Nikolic, R. B. Van Breemen, y R. B. Silverman, «Mechanism of inactivation of inducible nitric oxide synthase by amidines. Irreversible enzyme inactivation without inactivator modification», *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, n.º 3, pp. 858-868, ene. 2005, doi: 10.1021/ja0445645.
- [449] T. Cohen, M. Halfon, y D. Schneidman-Duhovny, «NanoNet: Rapid and accurate end-to-end nanobody modeling by deep learning», *Front. Immunol.*, vol. 13, p. 958584, ago. 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.958584.