



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**DIRECCIONAMIENTO DE ANTÍGENO DE CAPSIDE DE PCV2
HACIA CÉLULAS DENDRÍTICAS DEC205⁺ DE CERDO**

Por:

M. en C. Edgar Alonso Melgoza González

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

APROBACIÓN

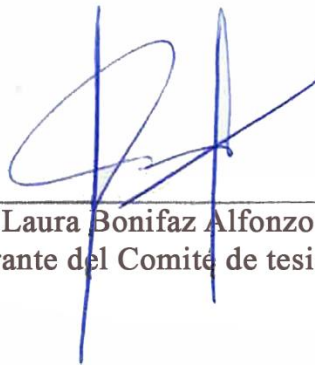
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Edgar Alonso Melgoza González, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.




Dr. Jesús Hernández López
Director de tesis



Dra. Verónica Mata Haro
Integrante del comité de tesis



Dra. Laura Bonifaz Alfonzo
Integrante del Comité de tesis



Dr. Armando Pérez Torres
Integrante del Comité de tesis

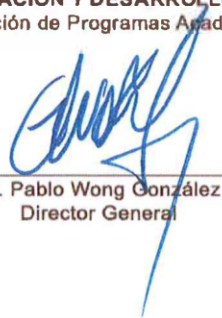
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Direccionamiento de Antígenos de la Cápside de PCV2 hacia Células Dendríticas DEC205+ de Cerdo” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Edgar Alonso Melgoza González, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento y beca otorgados durante mis estudios de posgrado, siendo una parte fundamental para culminar esta etapa.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. por recibirme como estudiante de posgrado y formarme durante estos años, aportando de manera sustancial a mi preparación como doctor.

A la Asociación IPVS-México 2014-001 la cual otorgó el financiamiento para el desarrollo de este proyecto de tesis doctoral.

A mi comité de tesis conformado por Dr. Jesús Hernández, Dra. Verónica Mata Haro, Dra. Laura Bonifaz Alfonzo y Dr. Armando Pérez Torres. Gracias por compartir su conocimiento y experiencia, sumando sus aportaciones para que el proyecto fuera desarrollándose de una mejor manera y así superar las dificultades que se presentaron durante el proceso. Todos y cada uno aportó no solo al proyecto, sino a mi formación como investigador y persona. Valoro mucho su apoyo y consejo.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Inmunología de CIAD: M.C. Mónica Reséndiz, Diana Hinojosa, Melissa García, Kenneth Contreras, Sofía Hernández, Verónica Vázquez, Maritza Cordero, Su apoyo en el laboratorio y amistad hicieron que las jornadas laborales se sintieran más ligeras y que los obstáculos se superaran más fácil. A mi ahora amiga y colega Aracely Tepale por el apoyo brindado en la última etapa experimental y las palabras de ánimo que me compartió.

A mis colegas, compañeras y amigas Lorena y Marlene por estar ahí siempre, siendo un gran apoyo en los momentos difíciles y compartiendo con gusto en los momentos de alegría. Que nuestra amistad siga madurando y creciendo con el paso del tiempo.

A mis amigos y hermanos de vida Alejandra, Ilce, Anita, Ana Karenth, Guillermo, Manuel y Addí por escucharme y aconsejarme cuando fue necesario. Porque esos momentos de dispersión y risas siempre han sido una recarga al ánimo que permiten ver la vida de mejor manera.

DEDICATORIA

*A mis hermanos Vania y Uriel y a mis padres, Elva Nora y Jesús:
Nada de lo que soy y que he logrado como persona y profesionalista sería posible sin su apoyo incondicional. Su ejemplo siempre me ha inspirado a ser mejor día con día y no conformarme sino hasta alcanzar la mejor versión de mí mismo.
Es una bendición que sean mis guías y pilares en la vida.*

*A mi abuela Artemisa y a mis abuelos que ya partieron Rigoberto y Mary.
Espero se sientan tan orgullosos de mi como yo de ustedes por lo que lograron en vida.*

¡Los amo!

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE CUADROS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES	15
2.1. Importancia de las DCs, Diversidad Fenotípica y Funcional.....	15
2.1.1. DCs Convencionales (cDCs)	15
2.1.1.1. cDC1.....	16
2.1.1.2. cDC2.....	16
2.1.2. DCs Plasmocitoides (pDCs).....	17
2.1.3. Células de Langerhans (LCs).....	17
2.1.4. DCs Derivadas de Monocitos (moDCs).....	18
2.2. Papel de las DCs en el Proceso de Presentación Cruzada.....	18
2.3. Características del Receptor DEC205 con Potencial de Presentación Cruzada.....	21
2.4. Caracterización del Direccionamiento hacia DCs DEC205 en Ratón.....	24
2.5. Caracterización del Direccionamiento hacia DCs DEC205 ⁺ en Humanos.....	25
2.6. Direccionamiento de Antígenos hacia DCs DEC205 en Animales de Granja.....	27
2.7. Circovirus Porcino Tipo 2 y Variantes Emergentes.....	28
2.8. Principales Antígenos del PCV2.....	29
3. HIPÓTESIS	32
4. OBJETIVOS	33
4.1. Objetivo General.....	33
4.2. Objetivos Particulares.....	33
5. MATERIALES Y MÉTODOS	34
5.1. Diseño de los Constructos de Expresión.....	34
5.2. Transformación de CQC <i>E. coli</i> TOP 10, <i>E. coli</i> BL21 Gold (DE3) y PCR de Colonia.....	35
5.3. Expresión, Purificación y Caracterización de rAbs ZH9F7-Cap, rAb ZH9F7-eGFP, rAb ZH9F7-tCap y rAb 7DEU-tCap.....	37
5.4. Expresión, Purificación y Caracterización de tCap en <i>E. coli</i> BL21 Gold (DE3).....	38
5.5. Animales.....	39

CONTENIDO (CONTINUACIÓN)

5.6. Evaluación del Tiempo de Vida Media del rAb ZH9F7 en Circulación Sanguínea.....	40
5.7. Aislamiento de Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMCs).....	40
5.8. Evaluación de la Internalización Mediada por Receptor con rAb ZH9F7.....	41
5.9. Reconocimiento de Células DEC205 ⁺ <i>In Vivo</i> por rAb ZH9F7 y rAb ZH9F7-tCap..	42
5.10. Evaluación del Reconocimiento <i>In Situ</i> de Células DEC205 ⁺ por Microscopia Confocal.....	43
5.11. Evaluación de la Respuesta Inducida por el Direccionamiento de rAb ZH9F7-tCap.....	44
5.12. Evaluación de Respuesta de Linfocitos T CD4 α^+ y CD8 α^+ Productores de IFN- γ	45
5.13. Adquisición por Citometría de Flujo y Análisis.....	45
5.14. Determinación de Respuesta Humoral Estimulada por el rAb ZH9F7-tCap.....	46
5.15. Análisis Estadísticos.....	47
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
6.1. Identificación de Colonias Positivas a los Constructos de Expresión.....	48
6.2. Expresión de rAb ZH9F7-Cap, rAb ZH9F7-eGFP, rAb ZH9F7-tCap y rAb 7DEU-tCap.....	50
6.3. Expresión de Antígeno Cap de PCV2 en Sistema <i>E. coli</i> BL21 Gold (DE3).....	53
6.4. Evaluación del Tiempo de Vida Media del rAb ZH9F7 en Circulación Sanguínea.....	54
6.5. Internalización de rAb ZH9F7 Mediada por Acoplamiento a Receptor DEC205.....	56
6.6. Evaluación de la Funcionalidad de rAb ZH9F7 Reconociendo Células DEC205 ⁺ <i>In Vivo</i>	59
6.7. Reconocimiento de DCs DEC205 ⁺ de Piel Porcina por Microscopia Confocal.....	66
6.8. Evaluación de la Funcionalidad del rAb ZH9F7-tCap Tiñendo Células DEC205 ⁺	68
6.9. Evaluación de la Respuesta Celular y Humoral Inducida por el rAb ZH9F7-tCap.....	74
7. CONCLUSIONES.....	79
8. RECOMENDACIONES.....	80
9. REFERENCIAS.....	81
10. APÉNDICES.....	93

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Mecanismos de presentación cruzada.....	20
2	Familia de receptores de lectinas tipo C.....	23
3	Características estructurales del PCV2.....	30
4	Representación esquemática de los diversos constructos para expresión del rAb ZH9F7-Cap, rAb ZH9F7-tCap, rAb 7DEU-tCap, rAb ZH9F7-eGFP y tCap de PCV2a.....	35
5	Análisis de productos de PCR de colonias <i>E. coli</i> TOP10 transformadas con pcDNA3.1(-)/SwHCZH9F7-Cap, pcDNA3.1(-)/SwLCZH9F7 y pcDNA3.1(+)/SwHCZH9F7-eGFP.....	48
6	Análisis de productos de PCR de colonias <i>E. coli</i> TOP10 transformadas con pcDNA3.1(-)/SwHCZH9F7-tCap y pcDNA3.1(-)/7DEU-tCap.....	49
7	Análisis de productos de PCR de colonias <i>E. coli</i> BL21 Gold (DE3) transformadas con pET28a(+)/tCap.....	50
8	Anticuerpos rAb ZH9F7-Cap y rAb ZH9F7-eGFP expresados en Expi293F y purificados.....	51
9	Anticuerpos rAb ZH9F7-Cap y rAb ZH9F7-eGFP expresados en Expi293F y purificados.....	52
10	Proteína tCap de PCV2a expresada en <i>E. coli</i> BL21 Gold (DE3) purificada por IMAC.....	54
11	Tiempo de vida media del rAb ZH9F7 en la circulación sanguínea.....	55
12	Internalización de receptor DEC205 después del acoplamiento del rAb ZH9F7 en cDC1, cDC2 y monocitos DEC205 ⁺	57
13	Porcentaje de intensidad media de fluorescencia (IMF) después de la incubación a 37°C y 4 °C.....	58
14	Identificación de células migratorias de explantes de piel positivas a la tinción con rAb ZH9F7 <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	60
15	Porcentajes de reconocimiento de cDC1, cDC2/LC y moDCs/Macro por la tinción con el rAb ZH9F7.....	61
16	Identificación de DCs, macrófagos y linfocitos de ganglios linfáticos inguinales teñidos con el rAb ZH9F7.....	63
17	Identificación de DCs, macrófagos y linfocitos de ganglios linfáticos inguinales teñidos con el rAb ZH9F7.....	64
18	Identificación de cDCs DEC205 ⁺ teñidas <i>in situ</i> con rAb ZH9F7-eGFP.....	67

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
19	Identificación de cDCs DEC205 ⁺ teñidas <i>in situ</i> con rAb ZH9F7-eGFP.....	69
20	Reconocimiento de cDC1, cDC2/LC y moDC/Macro DEC205 ⁺ en piel por rAb ZH9F7-Cap.....	71
21	Porcentajes de reconocimiento de cDC1, cDC2/LC y moDCs/Macro por la tinción con el rAb ZH9F7-tCap y control de isotipo rAb 7DEU-tCap.....	72
22	Identificación de DCs, macrófagos y linfocitos de ganglios linfáticos inguinales teñidos con el rAb ZH9F7-tCap.....	73
23	Porcentaje de DCs, linfocitos y macrófagos de ganglio linfático inguinal teñidos con el rAb ZH9F7-tCap.....	74
24	Linfocitos T productores de IFN- γ en respuesta a la estimulación <i>in vitro</i> con rAb ZH9F7-tCap en el grupo no vacunado y vacunado con rAb ZH9F7-tCap..	75
25	Representación de los porcentajes de células IFN- γ ⁺ por las poblaciones CD4 ⁺ CD8 ⁻ , CD4 ⁺ CD8 ⁺ y CD4 ⁺ CD8 ⁺	76
26	Esquema de inmunización y determinación de respuesta humoral.....	77

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Reactivos mezcla de reacción PCR de colonia.....	36
2	Condiciones de termociclador PCR de colonia.....	36
3	Secuencias de los iniciadores utilizados.....	36
4	Listado de anticuerpos empleados en citometría de flujo.....	46

RESUMEN

El direccionamiento de antígenos hacia el receptor endocítico DEC205⁺ presente en células dendríticas (DCs) ha mostrado ser una estrategia eficiente en la inducción de la respuesta inmune humoral y celular. Esta estrategia ha sido ampliamente caracterizada en el modelo murino, con gran eficiencia en la entrega de antígenos a las DCs con la posterior producción de anticuerpos y activación de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺. Lo anterior es resultado del proceso de presentación cruzada, el cual favorece el receptor DEC205 en DCs de ratón y humano. Sin embargo, los estudios de direccionamiento a DEC205 en animales domésticos, como en el modelo porcino, son escasos. En el presente estudio, evaluamos la capacidad del anticuerpo quimérico recombinante anti-DEC205 porcino (rAb ZH9F7) para promover el direccionamiento de antígenos a DCs DEC205⁺ *in vitro* e *in vivo*.

Los resultados indican que el rAb ZH9F7 anti-DEC205 porcino reconoció las subpoblaciones de DCs convencionales cDC1 y cDC2 en sangre, así como monocitos, desencadenando el proceso de endocitosis mediada por receptor. De igual manera, al evaluar la vida media del rAb ZH9F7 en circulación sanguínea, encontramos que fue detectado en circulación hasta 8 h después de ser aplicado vía intravenosa. Para la evaluación de la inmunogenicidad inducida por el direccionamiento *in vivo* se seleccionó la proteína de la cápside (Cap) del circovirus porcino tipo 2 (PCV2). La aplicación del rAb ZH9F7 vía intradérmica demostró que el rAb ZH9F7 con o sin antígeno Cap, reconoció las poblaciones cDC1, cDC22, LC y moDCs, pero el reconocimiento fue mayor frente a las células cDC1. Este reconocimiento reveló la presencia de DCs, linfocitos y macrófagos positivos a rAb ZH9F7 en los ganglios linfáticos regionales. Finalmente, el direccionamiento intradérmico con el rAb ZH9F7-Cap indujo un aumento en la frecuencia de linfocitos T CD4⁺CD8⁺ productores de IFN- γ específicos al antígeno Cap. Este direccionamiento también estimuló la respuesta humoral, lo cual se reflejó con la presencia de anticuerpos anti-Cap. En resumen, este trabajo demostró que el rAb ZH9F7 fue eficiente en dirigir antígenos a las DCs DEC205⁺, lo que activó la respuesta celular y humoral antígeno específica. Esta estrategia debe ser optimizada y demostrar que se induce una respuesta inmune protectora mejor a la que induce la proteína Cap sin direccionar.

Palabras claves: Direccionamiento de antígenos, porcino, DEC205, células dendríticas.

ABSTRACT

Antigen targeting to Dendritic cells (DCs) through endocytic receptor DEC205⁺ has been shown as an efficient strategy in the induction of humoral and cellular immune response. The strategy has been extensively characterized in the murine model, with great efficiency in delivering antigens to DCs inducing both humoral and cellular immune response, with the activation of CD4⁺ T and CD8⁺ T lymphocytes. These results are due to the cross-presentation process, which is favored by the DEC205 receptor in mouse and human DCs. However, targeting DEC205 studies in domestic animals, such as the swine model, are scarce. In the present study, we evaluated the ability of the recombinant chimeric porcine anti-DEC205 antibody (rAb ZH9F7) to promote antigen targeting to DEC205⁺ DCs *in vitro* and *in vivo*.

The results indicate that porcine anti-DEC205 rAb ZH9F7 recognized conventional DCs subpopulations cDC1 and cDC2 in blood, as well as monocytes, triggering the process of receptor-mediated endocytosis. Similarly, when evaluating the half-life of rAb ZH9F7 in blood circulation, we found that it was detected in circulation up to 8 h after intravenous application. For the evaluation of immunogenicity induced by targeting *in vivo*, the capsid protein (Cap) of porcine circovirus type 2 (PCV2) was selected. Intradermal application of rAb ZH9F7 showed that rAb ZH9F7 with or without Cap antigen recognized cDC1, cDC22, LC, and moDCs populations, but recognition was higher against cDC1 cells. This recognition revealed the presence of rAb ZH9F7-positive DCs, lymphocytes, and macrophages in regional lymph nodes. Finally, intradermal targeting with rAb ZH9F7-Cap induced an increase in the frequency of Cap antigen-specific IFN- γ -producing CD4⁺CD8⁺ T lymphocytes. This targeting also stimulated the humoral response, mirrored by the presence of anti-Cap antibodies. In summary, this work demonstrated that rAb ZH9F7 was efficient in targeting antigens to DEC205⁺ DCs, which activated the antigen-specific cellular and humoral response. This strategy should be optimized and confirm whether induces a better protective immune response compared with the non-targeting Cap protein.

Key words: Antigen targeting, porcine, DEC205, dendritic cells.

1. INTRODUCCIÓN

El uso de anticuerpos como herramientas profilácticas y terapéuticas ha sido explorado por más de dos décadas y su utilización en el direccionamiento de antígenos es una estrategia popular. Esta estrategia consiste en la entrega de antígenos hacia células presentadoras de antígenos (CPA), a través de anticuerpos que reconozcan receptores de superficie, con la finalidad de capturar, procesar y presentar tales antígenos a linfocitos T vírgenes (Alvarez *et al.*, 2013). Por esta habilidad intrínseca de las células dendríticas (DCs) para realizar estos procesos, son consideradas como un blanco atractivo para el desarrollo de vacunas basadas en el direccionamiento de antígenos. Varios autores han evaluado el efecto del direccionamiento de antígenos en el modelo porcino, teniendo como blanco diferentes receptores, a través de vías de vacunación como intravenosa, intramuscular, subcutánea e intradérmica (Badillo-Godinez *et al.*, 2015; Delputte *et al.*, 2011; Subramaniam, Cao, *et al.*, 2017).

Actualmente, las características de DCs derivadas de monocitos (moDCs), DCs plasmocitoides (pDCs) y DCs convencionales tipo 1 (cDC1) y tipo 2 (cDC2) han sido descritas en varias especies, incluyendo cerdos (Auray *et al.*, 2016; Iyoda *et al.*, 2002; Misharin *et al.*, 2013; O'Keeffe *et al.*, 2002; van de Ven *et al.*, 2011). Estas poblaciones de DCs son fenotípicamente diferentes y exhiben funciones compartidas entre especies (Franzoni *et al.*, 2019). Las moDCs de cerdo pueden estimular la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ hacia una respuesta tipo Th1, caracterizada por la producción de citocinas proinflamatorias (Liu *et al.*, 2016). Tanto las cDC1 como las cDC2 porcinas pueden capturar antígenos solubles en sangre, siendo las cDC2 una población con una mayor capacidad endocítica perfilada hacia la respuesta Th2. En contraste, la subpoblación de cDC1 en cerdo muestra una fuerte capacidad para llevar a cabo la presentación cruzada, estimulando así linfocitos T CD8⁺ para la producción de IFN- γ (Edwards *et al.*, 2017).

Para mejorar la capacidad de presentación cruzada por parte de las DCs, diversos investigadores han estudiado al receptor DEC205, miembro de la familia de receptores de lectinas tipo C, evaluando diferentes estrategias. Este receptor ha mostrado efectos positivos estimulando linfocitos T antígeno-específicos, consiguiendo de esta forma respuesta inmune antitumoral y antiviral (Badillo-Godinez *et al.*, 2015; Saluja *et al.*, 2014; Tsuji *et al.*, 2011; Volckmar *et al.*, 2017). Como ejemplo, Subramaniam y colaboradores (2017) evaluaron el direccionamiento de antígenos del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) hacia DCs DEC205⁺ en

cerdos. Se encontró que esta estrategia promovió la producción de IFN- γ e IL-4 por los linfocitos T CD4⁺. Sin embargo, los autores observaron pobre respuesta inmunogénica en su sistema de direccionamiento a DCs, posiblemente debido a la vía de aplicación empleada, dado que la presencia de poblaciones de DCs en tejido muscular es escasa (Subramaniam, Piñeyro, *et al.*, 2017).

Previamente, en piel de cerdo, se caracterizó la presencia de diversas poblaciones de DCs utilizando marcadores de fenotipo: CD172a⁺CD163⁻CADM⁺, CD172a^{-/low}CD163⁻ CADM⁺, CD172a⁺CD163^{low}CADM^{-/low} y CD172a⁺CD163^{high}CADM⁻ compatibles fenotípicamente con células de Langerhans (LCs), cDC1, cDC2 y moDCs, respectivamente (Marquet *et al.*, 2011a). Además, se ha demostrado que, en el cerdo, las poblaciones de LCs, cDC1 y cDC2 muestran habilidades de movilidad en un estado basal e inflamatorio, mientras que las moDCs solo migran bajo condiciones de inflamación (Marquet *et al.*, 2014). Adicionalmente, LCs y DCs dérmicas de ratón y humano son reconocidas cuando se utiliza un mAb anti-DEC205 aplicado por la vía intradérmica (Flacher *et al.*, 2010). En resumen, DCs dérmicas parecen ser un blanco prometedor para la aplicación de vacunas basadas en direccionamiento de antígenos.

Anteriormente, nuestro grupo de investigación reportó un anticuerpo recombinante quimérico ratón x cerdo con reactividad hacia el receptor DEC205 de cerdo, denominado rAb ZH9F7. Dicho anticuerpo quimérico se utilizó para direccionar antígenos de PRRSV hacia DCs DEC205⁺ dérmicas (Bustamante-Córdova *et al.*, 2021; Bustamante-Córdova *et al.*, 2019). Los resultados obtenidos mostraron que la estrategia fue capaz de estimular una respuesta protectora limitada. Por lo tanto, surgen diversas preguntas respecto al cómo el direccionamiento de antígenos hacia el receptor DEC205 puede estimular una respuesta inmune protectora y cómo esta respuesta podría ser optimizada utilizando el direccionamiento de antígenos de otros patógenos como el Circovirus porcino tipo 2 (PCV2).

El PCV2 perteneciente a la familia *Circoviridae*, es un virus no icosaédrico sin envoltura con un genoma conformado por una molécula de DNA circular de cadena sencilla de menos de 2,000 nucleótidos de extensión. Por lo tanto, es considerado el miembro más pequeño de la familia (Tischer *et al.*, 1982). En el genoma de PCV2, es el marco de lectura abierto 2 (ORF2) quien codifica la proteína de cápside o Cap, el mayor componente estructural, así como principal blanco de la respuesta inmune humoral y celular (Fort *et al.*, 2010; Nawagitgul *et al.*, 2002). Esta característica hace que la Cap del PCV2 sea un objetivo apropiado para evaluar su efecto en la respuesta celular y humoral tras su direccionamiento hacia DCs DEC205⁺ en cerdos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Importancia de las DCs, Diversidad Fenotípica y Funcional.

Las DCs son parte fundamental del sistema inmune innato y juegan un papel importante en el inicio y regulación de la respuesta adaptativa (Banchereau & Steinman, 1998). Su principal función radica en el reconocimiento, captura y procesamiento de los antígenos, con el propósito de presentar péptidos inmunogénicos a los linfocitos T vírgenes e iniciar la respuesta inmune adaptativa (Fadilah & Cheong, 2007). El reconocimiento e internalización de antígenos está mediado por receptores en la superficie de las DCs. Algunos ejemplos son: receptores para el Fc de las inmunoglobulinas, receptores de complemento, integrinas, receptores tipo lectina C como DC-SIGN, DEC205, langerina, receptor de manosa (Clark *et al.*, 2000; Platt *et al.*, 2010). Estas células tienen la característica de estimular a los linfocitos T vírgenes tanto *in vitro* como *in vivo*, mediando el establecimiento de una respuesta inmune específica. Además, pueden inducir la activación de las células NK y la activación de los linfocitos B a células productoras de anticuerpos (Banchereau *et al.*, 2000).

En los modelos murino y humano se han reportado diversas poblaciones de DCs que difieren desde su ontogenia, migración, capacidad de activación de linfocitos T vírgenes, así como polarización en la respuesta celular Th1, Th2 o Th17 que inducen. Todas las DCs expresan HLA-DR y carecen de marcadores de linaje de linfocitos T (CD3), linfocitos B (CD19/20) y de NKs (CD56).

2.1.1. DCs Convencionales (cDCs)

Las cDCs provienen de precursores mieloides con marcadores CD11c, CD13, CD33 y CD11b, con desarrollo dependiente de la tirosina quinasa 3 similar a FMS (FLT3) y su unión al ligando FLT3L (Ginhoux *et al.*, 2009). Este tipo de DC puede además dividirse en dos poblaciones denominadas DCs convencionales tipo 1 (cDC1) y tipo 2 (cDC2) que se caracterizan por lo siguiente:

2.1.1.1. cDC1: Se encuentran distribuidas en sangre, piel, en ganglios linfáticos como células residentes y migratorias (Segura *et al.*, 2012). En humanos la población CD141⁺ (BDCA-3) es equivalente a la subpoblación CD103⁺/CD8 α ⁺ en ratón y, de manera similar a las cDC1 en otras especies, expresan XCR1 y CLEC9A los cuales, hasta el momento, han sido considerados marcadores universales para las DCs. Su desarrollo requiere del factor de transcripción BATF-3 y tienen la característica de tener alta expresión de IRF-8 (Auray *et al.*, 2016; Hildner *et al.*, 2008). Al igual que la población CD103⁺/CD8 α ⁺ murina, en humano se expresa DEC205 en altos niveles, con gran capacidad para llevar a cabo presentación cruzada (Bedoui *et al.*, 2009; Kato *et al.*, 2006). Este tipo celular tiene alta capacidad para producir IL-12 polarizando así una respuesta de linfocitos T CD4⁺ hacia el perfil Th1 (Villadangos & Shortman, 2010). Tienen, además, al igual que las cDC2, un papel importante en la activación de linfocitos B foliculares apoyando el proceso de proliferación y maduración de células B (Kato *et al.*, 2020). En cerdos, esta población se identifica como CD14⁻CD172a^{-/low}CADM1⁺wCD11R1(CD11b)⁺DEC205⁺XCR1⁺CLEC9A⁺ dependientes de BATF3 (Auray *et al.*, 2016).

2.1.1.2. cDC2: Al igual que las cDC1, expresan marcadores mieloides y se encuentra distribuidas en todo el organismo. En humanos su fenotipo es CD1c (BDCA-1)⁺ CD11c⁺ CD11b⁺ Sirp α (CD172a)⁺, siendo equivalente a la población de DCs CD11b⁺ murina. Tienen alta expresión de IRF-4 y su desarrollo es dependiente del factor de transcripción RelB (Briseño *et al.*, 2017). En la población de DCs dérmicas de humano, las cDC2 se caracterizan por la expresión del receptor CD1a aunque en menor grado que las LCs (van de Ven *et al.*, 2011). A diferencia de su contraparte en ratón, en humanos este tipo celular expresa DEC205 y se ha reportado con capacidad de presentación cruzada, aunque menos eficiente que la población cDC1 (Kato *et al.*, 2006; Nizzoli *et al.*, 2013). Funcionalmente, se han caracterizado por mediar la inducción de respuestas tipo Th2 y Th17 (Schlitzer *et al.*, 2013). Pueden encontrarse en ganglios linfáticos en la zona de células T como células interdigitantes. En cerdo el fenotipo que presenta es CD135⁺CD14⁻CD172a⁺CADM1⁺CD115⁺wCD11R1⁺CD1⁺DEC205⁺ (Auray *et al.*, 2016).

2.1.2. DCs Plasmacitoides (pDCs)

Proviene de precursores linfoides y carecen de los marcadores mieloides previamente mencionados. Sin embargo, expresan los marcadores CD123, CD303 (BDCA-2) y CD304 (BDCA-4) y su desarrollo depende de del factor de transcripción E2-2 (Cisse *et al.*, 2008; Solano-Gálvez *et al.*, 2018). Se encuentran principalmente en sangre y ganglios linfoides, sin embargo, su presencia en piel no es muy común. Por otro lado, su importancia funcional radica en la respuesta antiviral, por lo que están equipadas con los receptores tipo Toll (TLR) como el TLR3, TLR7 y TLR9, para la detección de antígenos virales seguido de la expresión de altos niveles de IFN tipo I (Auray *et al.*, 2020; Lauterbach *et al.*, 2010). Ante el inicio de un proceso inflamatorio estas células pueden poblar órganos linfoides y no linfoides como la piel. Estas células también expresan el receptor DEC205 en humano y ratón (Artyomov *et al.*, 2015; Sengupta *et al.*, 2019). Se han reportado con capacidad de llevar a cabo presentación cruzada, activando linfocitos T CD8⁺ posterior a ser estimuladas vía TLR7 o TLR9 pero no en un estado basal complementario a la activación de linfocitos T CD4⁺, promoviendo respuestas Th1 o Th2 (Mouries *et al.*, 2008; Young *et al.*, 2008). En cerdos el fenotipo es CD135⁺CD14⁺CD4⁺CD172a⁺CD123⁺CD303⁺DEC205⁺ (Auray *et al.*, 2016).

2.1.3. Células de Langerhans (LCs)

Estas células dendríticas residentes de la epidermis ocupan alrededor del 5% de las células nucleadas y se generan durante el desarrollo embrionario, momento en el cual salen del hígado y colonizan la epidermis (Ginhoux & Merad, 2010). Presentan limitada capacidad auto regenerativa, pero en condiciones de inflamación, donde esta población podría quedar reducida, pueden derivarse a partir de monocitos en circulación. Expresan alto nivel de CD207 (Langerina), CD1a⁺ y baja expresión de CD11c (Romani *et al.*, 2010). Morfológicamente se observan gránulos en compartimientos endosómicos con altas concentraciones de Langerina lo cuales son llamados gránulos de Birbeck. Tanto en humano como en murinos se expresa el receptor DEC205 (Bellmann

et al., 2021; Valladeau *et al.*, 2002). En humano, esta población tiene capacidad de llevar a cabo presentación cruzada de manera similar a la población murina CD103⁺/CD8 α ⁺ (Artyomov *et al.*, 2015; Fehres *et al.*, 2017). Al igual que las cDC2, pueden encontrarse en ganglios linfáticos en la zona de células T como células interdigitantes. Pueden inducir respuesta de perfil Th17 o Treg bajo diferentes condiciones y son consideradas jugar un papel importante en la tolerancia periférica (Fujita *et al.*, 2009; Igyarto *et al.*, 2009). En cerdo el fenotipo de esta población es CD1a⁺, CD16⁺, CADM1⁺, CD207⁺, CD1⁺ CD163⁻ DEC205⁺ (Marquet *et al.*, 2011b; Marquet *et al.*, 2014).

2.1.4. DCs Derivadas de Monocitos (moDCs)

Estas DCs también conocidas como DCs inflamatorias, se generan a partir de monocitos que migraron al órgano dañado en respuesta a estímulos inflamatorios con capacidad de migración a ganglios linfáticos regionales (León *et al.*, 2007). Su desarrollo no es dependiente de factores de transcripción relacionados con las cDCs o pDCs. Usualmente se ubican en órganos no linfoides en ausencia de inflamación. Expresan CD11c⁺, CD11b⁺, CD1a⁺, CD14⁺, este último evidencia su origen a partir de monocitos que migraron al sitio de inflamación. En humano y cerdo esta población se ha reportado con diferente grado de expresión de DEC205 en comparación con otras poblaciones de DCs (Flores-Mendoza *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2000). Además, tienen capacidad de activación de linfocitos T vírgenes y llevan a cabo presentación cruzada (Coillard & Segura, 2021). La polarización en la respuesta de linfocitos T es hacia el perfil Th1 o Th2 (León *et al.*, 2007; Mochizuki *et al.*, 2013). En cerdo esta población expresa CD206⁺CD209⁺CD172a⁺ CADM1⁺DEC205⁺.

2.2. Papel de las DCs en el Proceso de Presentación Cruzada

Bajo un esquema convencional de procesamiento y presentación de antígenos, aquellos que son capturados del espacio extracelular siguen una ruta de procesamiento y presentación por la vía de

MHC-II. Los antígenos reconocidos dentro del espacio intracelular son procesados y presentados por la vía MHC-I. Sin embargo, una característica peculiar de las DCs es su capacidad para realizar presentación cruzada. Esto consiste en que además de las vías previamente expuestas, pueden capturar antígenos extracelulares llevando a cabo un procesamiento y presentación por la vía MHC-I y activar de esta forma linfocitos T CD8⁺. Esta respuesta tiene un papel importante en el establecimiento de respuestas hacia antígenos virales y tumorales.

Actualmente, existen diversos mecanismos que se han estudiado para evaluar cómo este proceso puede ser llevado a cabo. En la figura 1 se representan las dos vías principales por las cuales un antígeno extracelular puede tener acceso a la vía de presentación de MHC-I. La primera de ellas, la vía citosólica, implica que el antígeno internalizado pueda escapar desde el lumen del endosoma hacia el citosol y posteriormente ser marcado para degradación por el proteasoma (Saluja *et al.*, 2014). Una vez degradado, los péptidos obtenidos del antígeno pueden ser transportados hacia el lumen del retículo endoplásmico por los transportadores asociados al procesamiento de antígenos (TAP) o nuevamente hacia los endosomas. De esta manera, los péptidos obtenidos de un antígeno extracelular podrían ser ensamblados en las moléculas de MHC-I recién sintetizadas y ser proyectados en la superficie celular, donde posteriormente se llevará a cabo la presentación a linfocitos T CD8⁺. En el modelo murino, existe evidencia del escape de antígenos capturados del espacio extracelular hacia el citoplasma, evaluado en la población de DCs CD8α⁺ caracterizadas por su eficiente capacidad de presentación cruzada (Lin *et al.*, 2008).

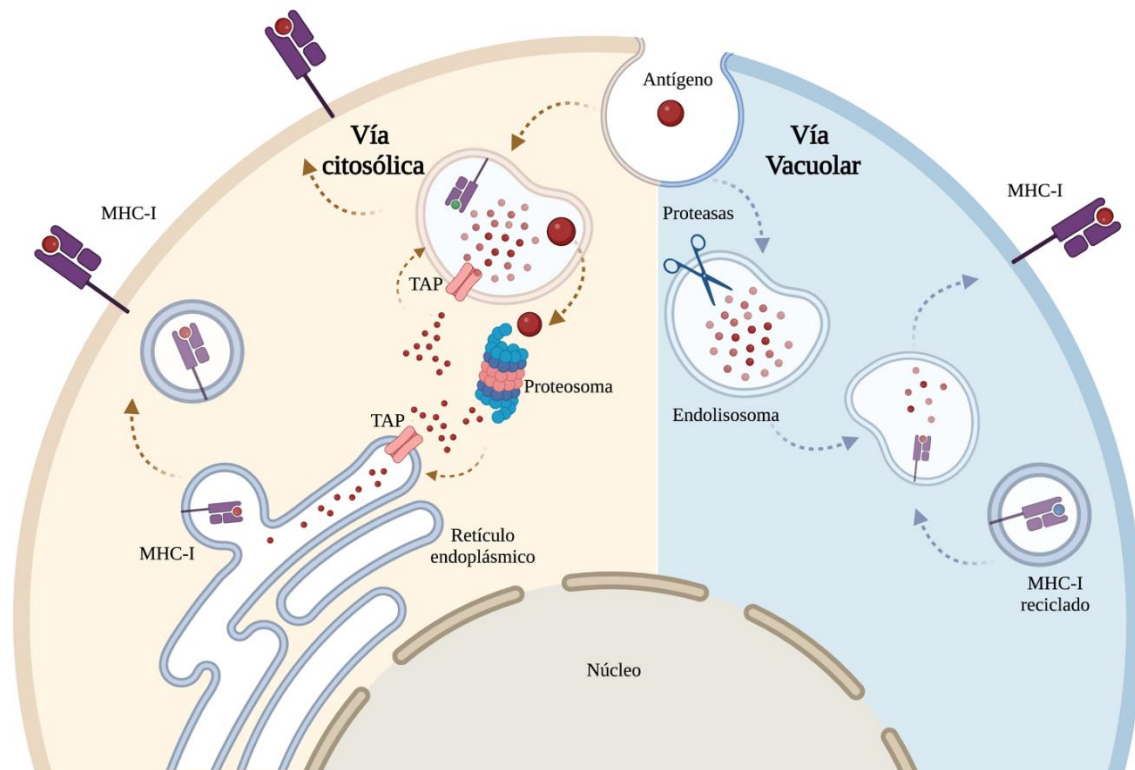


Figura 1. Mecanismos de presentación cruzada por la célula presentadora de antígeno. Modificado de (Joffre *et al.*, 2012).

Por otro lado, la vía vacuolar implica que los antígenos contenidos en los compartimentos endocíticos sean degradados por proteasas lisosomales y, posteriormente, la maquinaria de la vía MHC-I pueda ser reclutada para permitir el ensamblaje de los péptidos dentro del endosoma. En este escenario, la degradación de los antígenos ocurre dentro del endosoma. Posteriormente, moléculas de MHC-I que se reciclan desde la superficie, pueden fusionarse con los endolisosomas y posibilitar que los péptidos recién generados sean acoplados a ellas (Basha *et al.*, 2008). Tanto en DCs de ratón como de humano, la inhibición de las cisteína proteasas o evitar la acidificación endosomal, afecta negativamente la presentación cruzada por la vía vacuolar, confirmando así la actividad de una vía alterna TAP-proteosoma independiente (Bertholet *et al.*, 2006; Di Pucchio *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2004). El bloqueo de esta vía no evita la presentación cruzada por las DCs $CD8\alpha^+$ mientras que las moDCs inflamatorias reducen significativamente este mecanismo, lo que demuestra que en las DC *bona fide* e inflamatorias el proceso de presentación cruzada funciona bajo diferentes vías (Segura *et al.*, 2009).

A diferencia de los macrófagos, que rápidamente acidifican sus endosomas activando mecanismos

de proteólisis, las DCs tienen la capacidad de evitar la activación de proteasas lisosomales alcalinizando sus endosomas (Delamarre *et al.*, 2005). Este proceso es llevado a cabo por la producción de especies reactivas de oxígeno ROS, que pueden evitar la acidificación del endosoma, retardando así la degradación de los antígenos internalizados con la posibilidad de escape al citosol y posterior presentación cruzada (Savina *et al.*, 2006). Se ha observado que la depleción de DCs CD11c⁺ en el modelo murino compromete significativamente la presentación cruzada y activación de linfocitos T CD8⁺ (Jung *et al.*, 2002). De igual forma, al suprimir la población de DCs CD8α⁺ en el modelo murino, la respuesta antiviral y antitumoral mediada por linfocitos T CD8⁺ se afecta negativamente (Hildner *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2002). Debido a estas características, se entiende el papel de las DCs como células indispensables en la presentación cruzada enfatizando su potencial para el desarrollo de estudios de direccionamiento de antígenos o implementación de vacunas basadas en DCs.

Considerando la heterogeneidad entre las diversas poblaciones de DCs, tanto fenotípicamente como funcionalmente, es evidente que surjan dudas respecto a su capacidad para llevar a cabo el proceso de presentación cruzada.

2.3. Características del Receptor DEC205 con Potencial de Presentación Cruzada

El receptor DEC205 (Ly75 o CD205) es un miembro de la familia de receptores de lectinas tipo C, cuya unión a carbohidratos es dependiente de calcio, misma familia en la que se encuentran otros receptores como el receptor de manosa, langerina, DC-SIGN, entre otros. Este receptor endocítico se expresa predominantemente en DCs, aunque también se reporta en diversos tipos celulares como en macrófagos, linfocitos T y linfocitos B, con expresión diferencial entre especies (Auray *et al.*, 2016; Idoyaga *et al.*, 2011; Kato *et al.*, 2006; Talker *et al.*, 2018).

Dentro de esta familia, el DEC205 está formado por un dominio citoplasmático pequeño y un gran dominio extracelular conformado por diversos subdominios: ricos en cisteína, fibronectina tipo II y 10 dominios continuos de reconocimiento de carbohidratos (Figdor *et al.*, 2002). Mientras el dominio extracelular está involucrado en el reconocimiento de antígenos, el extremo citoplasmático del receptor DEC205 contiene secuencias que regulan su orientación intracelular y

posterior reciclado (Jiang *et al.*, 1995). La figura 2 muestra una representación esquemática de la familia de receptores de lectinas tipo C, entre las cuales se muestran las características estructurales del receptor DEC205. Este receptor se ha caracterizado en ratones, humanos, ovejas y cerdos (Flores-Mendoza *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 1995; Kato *et al.*, 1998; Swiggard *et al.*, 1995). En el modelo porcino, la estructura del receptor DEC205 conserva una identidad del 81% y 74% con las secuencias de DEC205 murina y humana, respectivamente (Flores-Mendoza *et al.*, 2010). Por lo anterior, es posible que sus características funcionales sean conservadas entre las diferentes especies.

El dominio intracelular del receptor DEC205 lo dirige hacia los endosomas tardíos, posibilitando el encuentro con vesículas ricas en moléculas MHC-II. Una característica de este receptor es que tiene la capacidad de reciclarse desde los endosomas tardíos, incrementando la presentación de antígenos por MHC-II hasta 100 veces más que el receptor de manosa (Mahnke *et al.*, 2000). La región involucrada en este tráfico intracelular y posterior reciclaje hacia la superficie, es una región distal con una tríada EDE que dirige hacia endosomas tardíos y de esta forma, alcanzar la maquinaria para ensamblaje en MHC-II. Es importante destacar que la porción intracelular de DEC205 no cuenta con un dominio de activación celular por lo que, el simple acoplamiento del receptor a un ligando o anticuerpo no garantiza la activación de la DC y su subsecuente maduración (Bonifaz *et al.*, 2002).

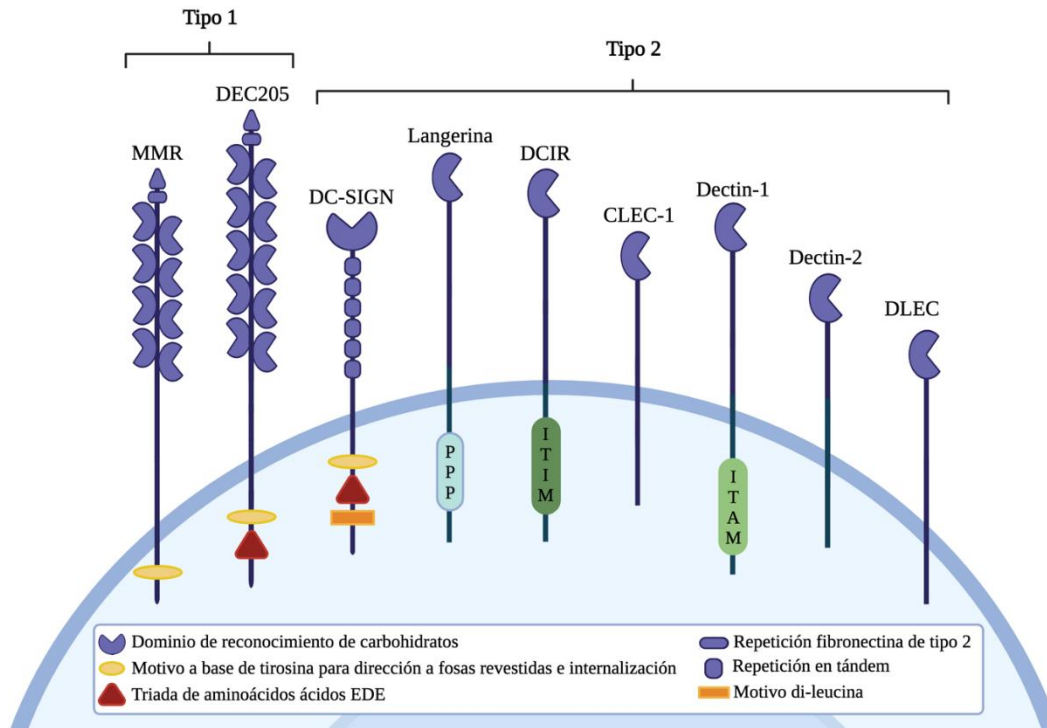


Figura 2. Familia de receptores de lectinas tipo C. Descripción estructural de los miembros de la familia en la que se encuentra el receptor DEC205. Modificado de (Figdor *et al.*, 2002).

A pesar de que no se ha determinado un ligando específico para el receptor DEC205, se ha reportado como un receptor “promiscuo”, con capacidad de reconocimiento de moléculas extrañas e incluso propias. Se ha descrito que el DEC205 tiene capacidad de reconocer motivos CpG presente en el DNA de algunas bacterias y virus, permitiendo su actividad como receptor de reconocimiento de patrones (Lahoud *et al.*, 2012). Otros autores reportan que DEC205 es un receptor que reconoce antígenos expresados durante la necrosis y apoptosis en diversos tipos celulares y posiblemente, mantener un estado de tolerancia hacia antígenos propios (Cao *et al.*, 2016; Figdor *et al.*, 2002; Shrimpton *et al.*, 2009).

Aun sin haber sido establecido un ligando específico para DEC205, ha sido blanco para el desarrollo de anticuerpos monoclonales que puedan acoplarse a él, acarrear y entregar antígenos a las DCs (Alvarez *et al.*, 2013; Bonifaz *et al.*, 2002; Bonifaz *et al.*, 2004). Esta herramienta de direccionamiento, dependiendo de la estrategia, puede promover el desarrollo de una respuesta de tolerancia periférica (en ausencia de estímulos de activación) o la activación de la respuesta por linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Badillo-Godinez *et al.*, 2015; Bonifaz *et al.*, 2002; Spiering *et al.*, 2015).

La característica más interesante del receptor DEC205, misma que lo posiciona como un blanco popular en direccionamiento de antígenos hacia DCs, es que promueve la presentación cruzada. Lo anterior resulta de la internalización de antígenos extracelulares los cuales son posteriormente procesados y presentados en contexto no sólo en MHC-II sino también MHC clase I, promoviendo la activación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Joffre *et al.*, 2012).

2.4. Caracterización del Direccionamiento hacia DCs DEC205 en Ratón

Las DCs son muy reconocidas como una pieza clave en la inmunidad adaptativa, desempeñando un papel crucial como puente entre la respuesta innata y adaptativa. Particularmente, su alta capacidad y eficiencia para llevar a cabo la presentación cruzada activando linfocitos T CD4⁺ como CD8⁺, las ha destacado como un blanco para desarrollo de vacunas. En consecuencia, las DCs han sido ampliamente estudiadas en ensayos de direccionamiento de antígenos, teniendo como blanco a diferentes receptores endocíticos, aplicado por diferentes rutas, en diversas especies como humanos, ratones, gallinas, bovinos y cerdos (Bonifaz *et al.*, 2004; Deloizy *et al.*, 2017; Fossum *et al.*, 2015; Jáuregui-Zúñiga *et al.*, 2017; Njongmeta *et al.*, 2012; Shrestha *et al.*, 2021; Subramaniam, Piñeyro, *et al.*, 2017; Tsuji *et al.*, 2011). Entre los receptores blanco para el direccionamiento de antígenos hacia DCs se encuentran el CD11c, XCR1, DC-SIGN, Langerina y DEC205, siendo este último uno de los más populares (Chrun *et al.*, 2018; Idoyaga *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2017; Subramaniam, Piñeyro, *et al.*, 2017; Tsuji *et al.*, 2011).

En el modelo murino, la evaluación de la funcionalidad y fenotipo de las DCs ha sido ampliamente estudiado. Se han caracterizado diversas poblaciones celulares que expresan el receptor DEC205, entre las que se encuentra la población CD8 α ⁺/CD103⁺ las cuales representan la población de cDC1 en ganglios linfáticos y órganos no linfoides, las DCs dérmicas y LC. En este modelo son las poblaciones CD8 α ⁺/CD103⁺ las que han sido caracterizadas por su habilidad de inducir la respuesta tipo Th1 (Harpur *et al.*, 2019).

Gran parte de la información obtenida en ensayos de direccionamiento de antígenos hacia DCs y otras poblaciones celulares, se ha generado en el modelo murino. Los primeros reportes de la evaluación de direccionamiento de antígenos en este modelo se llevaron a cabo empleando

ovoalbúmina (OVA) acoplada a un mAb anti-DEC205. La respuesta de proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ así como en la producción de IFN- γ fue significativamente optimizada en el grupo tratado con el OVA-anti-DEC205, en contraste al grupo antígeno sin direccionar (Bonifaz *et al.*, 2004). En el mismo modelo, se observó que el direccionamiento vía subcutánea produce una respuesta sistémica, detectando el anticuerpo anti-DEC205 en órganos linfoides distales hasta 3 días post-inyección. En la evaluación de antígenos de *Trypanosoma cruzi* hacia DCs DEC205⁺, la producción de IFN- γ y proliferación de linfocitos T CD4⁺ fue marcadamente incrementada, a diferencia de su contraparte sin direccionar (Rampazo *et al.*, 2015).

Tras la evaluación del direccionamiento a DCs DEC205 aplicado intradérmicamente, se analizó la presencia de células migratorias positivas al marcaje con el anti-DEC205. De esta manera, en ganglios linfáticos regionales se encontraron tanto LC como DCs dérmicas (Langerin⁺CD103⁺cDC1 y Langerin⁻CD103⁻CD11b⁺cDC2) las cuales mostraron un 86% y 6.6% de positividad al marcaje con el anti-DEC205, respectivamente, lo que indica que fueron células migratorias de la piel y no residentes del ganglio linfático. Aunado a lo anterior, el efecto de direccionamiento por transporte pasivo a través del drenaje linfático también fue comprobado, lo que indica que el direccionamiento es una combinación entre el transporte activo y pasivo de antígenos (Flacher *et al.*, 2012).

2.5. Caracterización del Direccionamiento hacia DCs DEC205⁺ en Humanos

En humanos, DEC205 es expresado en diferentes poblaciones celulares. En sangre periférica DEC205 se expresa en altos niveles en DCs mieloides y monocitos, niveles moderados en linfocitos B y bajos niveles en células NK, pDCs y linfocitos T (Kato *et al.*, 2006). En monocitos y moDC se ha confirmado que el acoplamiento del mAb-anti DEC205 promueve la internalización del complejo anticuerpo-receptor (Butler *et al.*, 2007). En la piel es expresado principalmente en DCs dérmicas, aunque las LC también muestran una baja expresión de este (Stoitzner *et al.*, 2014). El direccionamiento de antígeno nuclear 1 del Epstein Bar virus, hacia DEC205 tuvo un mayor efecto sobre las DCs CD141⁺ produciendo la activación de linfocitos T CD4⁺ secretoras de IFN- γ (Meixlsperger *et al.*, 2013). Esta población se ha reconocido como homóloga a las DCs CD103⁺

de ratón, con una alta expresión de DEC205.

En la evaluación y caracterización del mecanismo de direccionamiento a DCs DEC205⁺ vía piel, la aplicación intradérmica del mAb anti-DEC205 *ex vivo*, mostró que las DCs CD1a⁺ dérmicas presentaron una mayor capacidad de ser teñidas en comparación con las DC CD14⁺. De igual forma, las LC fueron eficientemente teñidas *ex vivo*. En dichos experimentos, la aplicación de poly (I:C) indujo una mayor expresión de DEC205 en DCs dérmicas y LC, mejorando las capacidades de reconocimiento de dichas poblaciones por el mAb anti-DEC205 (Stoitzner *et al.*, 2014). En el mismo modelo humano, la expresión de DEC205 es sobre regulada posterior a la maduración de las DCs dérmicas y LC mientras que no hubo un efecto en la población de DCs CD14⁺. De esta manera, la importancia de un estímulo de maduración en el direccionamiento a DCs DEC205⁺ puede optimizar el proceso de reconocimiento y captura por parte de las DCs dérmicas (Birkholz *et al.*, 2010; Ebner *et al.*, 2004).

El direccionamiento hacia DCs dérmicas y LC *ex vivo* ha mostrado como resultado la estimulación de linfocitos T productores de IFN- γ y TNF- α en el que los macrófagos CD14⁺ no presentaron un efecto de reconocimiento (Bellmann *et al.*, 2021). En la evaluación de direccionamiento de antígenos *in vitro* utilizando moDCs DEC205⁺ de humano, se favoreció el proceso de presentación por la vía MHC-II activando así linfocitos T CD4⁺ (Birkholz *et al.*, 2010). En contraste, el direccionamiento de antígenos de melanoma cargados en nanopartículas recubiertas con anti-DEC205, permitió el escape endosoma-citosol en moDCs, posibilitando la presentación a linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (Saluja *et al.*, 2014). En este último, la utilización de un sistema de entrega basado en nanopartículas parece beneficiar el escape de los antígenos hacia el espacio citoplasmático, posibilitando el proceso de presentación cruzada.

Recientemente se ha reportado un estudio clínico en fase 2, el cual evaluó el direccionamiento del antígeno NY-ESO-1 hacia DCs DEC205⁺ en humanos, vía subcutánea-intradérmica. La estrategia incluyó la administración del ligando FLT3L junto con el uso del adyuvante poly-ICLC. En la evaluación *in vivo*, el pre-tratamiento de los individuos con aplicación de FLT3L permitió el reclutamiento y expansión de cDC1, cDC2 y pDC en el sitio de aplicación, con la activación subsecuente de células T CD4⁺ y CD8⁺ producto del direccionamiento a DCs DEC205⁺ (Bhardwaj *et al.*, 2020; Saluja *et al.*, 2014). De esta forma, las estrategias, vías y sistemas de direccionamiento de antígenos se han mostrado muy heterogéneas, obteniendo, por tanto, diversidad en los resultados obtenidos. La búsqueda constante de nuevas estrategias para optimizar la respuesta y procesos de presentación cruzada en direccionamiento a DCs DEC205⁺ y otros blancos, sigue siendo un objeto

de estudio y escrudiño.

2.6. Direccionamiento de Antígenos hacia DCs DEC205 en Animales de Granja

En aves, el direccionamiento de antígenos de influenza aviar hacia DEC205 mejoró la respuesta de anticuerpos totales y neutralizantes, aunque la respuesta celular mediada por IFN- γ , IL-6, e IL-1 β , no mostró un efecto positivo (Jáuregui-Zúñiga *et al.*, 2017; Shrestha *et al.*, 2021). En el mismo modelo, el direccionamiento de antígenos tumorales del virus del sarcoma de Rous indujo respuesta Th1 mediada por la producción de IL-12, IL-2 e IFN- γ sin presentar un efecto en la respuesta humoral (Mucksová *et al.*, 2017). Es interesante que aun en el mismo modelo, el mismo tipo celular y receptor blanco, la respuesta obtenida por el direccionamiento de antígenos mostró resultados contrastantes.

En bovinos, el direccionamiento de antígenos de *Anaplasma marginale*, empleando anticuerpos scFv anti-DEC205, aumentó el número de células T CD4⁺ productoras de IFN- γ , proliferación de linfocitos CD4⁺ y altos títulos de anticuerpos IgG (Njongmeta *et al.*, 2012). En ovinos, el direccionamiento de antígenos del virus de la fiebre del valle del Rift hacia DCs DEC205⁺ estimuló mayor frecuencia de linfocitos T productores de IFN- γ aunque la respuesta humoral no mejoró, sin promover un efecto protector ante un desafío viral (Chrun *et al.*, 2018).

En el modelo porcino se han caracterizado diversas poblaciones de células DEC205⁺ en sangre periférica entre las cuales, cDC1 presentan una mayor expresión, seguidos de cDC2, monocitos y pDCs (Auray *et al.*, 2016). En órganos linfoides como bazo, ganglios linfáticos mesentéricos, submaxilar y tonsila, tanto cDC1 como cDC2 han sido descritas con una variante expresión de DEC205, así como en DCs dérmicas (Flores-Mendoza *et al.*, 2012; Parra-Sánchez *et al.*, 2018). A pesar de que se han caracterizado diversas poblaciones de DCs DEC205⁺, sólo se han reportado un par de ensayos que evalúan la respuesta de direccionamiento de antígenos hacia DCs DEC205⁺ en cerdo. En uno de ellos, llevado a cabo por Subramaniam *et al.*, (2017), se direccionaron antígenos del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV), sin encontrar mejoría en los títulos de anticuerpos y en la respuesta celular en comparación al grupo sin direccionar (Subramaniam, Piñeyro, *et al.*, 2017). Se discute que, bajo las condiciones evaluadas, la ruta de aplicación subcutánea no resultó favorable para el objetivo planteado. Posteriormente, direccionando antígenos de PRRSV, vía intradérmica en el mismo modelo, se logró incrementar

los títulos de anticuerpos y frecuencia de linfocitos T CD4⁺ productores de IFN- γ , aunque no hubo respuesta robusta y tampoco un efecto protector ante el desafío viral (Bustamante-Córdova *et al.*, 2019).

A pesar de que la estrategia ha mostrado resultados interesantes respecto a su funcionalidad, los resultados obtenidos son impredecibles, presentando diversidad en la inducción de respuesta humoral y celular. Por lo tanto, no está claro cómo las diferentes poblaciones de DCs DEC205⁺ son blanco del direccionamiento y cómo esta estrategia puede ser optimizada con el objetivo de hacerla más eficiente, para nuestro interés, en el modelo porcino. De esta forma, el objetivo del presente trabajo fue analizar paso a paso cómo es que tanto *in vitro* como *in vivo*, diferentes poblaciones blanco del direccionamiento a través de DEC205 son teñidas tanto en sangre como en tejidos porcinos y cómo estos resultados empatan con la respuesta inmune obtenida.

2.7. Circovirus Porcino Tipo 2 y Variantes Emergentes

Circovirus porcino (PCV) fue descrito por primera vez como un contaminante que infectaba persistentemente cultivos de células de riñón de cerdo, línea celular PK-15 (Tischer *et al.*, 1974). Perteneciente a la familia *Circoviridae*, el virus icosaédrico no envuelto posee en su genoma una molécula circular de DNA de cadena sencilla, con extensión menor a 2000 nucleótidos, considerado el miembro más pequeño de la familia (Tischer *et al.*, 1982). Actualmente se han descrito diversos PCV con organización genómica similar, aunque difieren en su patogenicidad y en diversidad de genotipos. Las enfermedades asociadas a Circovirus porcino se manifiestan clínicamente como el síndrome de desgaste multisistémico post-destete, enfermedades entéricas, respiratorias, fallos reproductivos, síndrome de nefropatía y dermatitis porcina (Opriessnig *et al.*, 2007). Afectan principalmente a lechones entre 5-18 semanas de edad y la tasa de morbilidad varía del 15 al 80% en casos complicados (Lv *et al.*, 2014). Dichas enfermedades son de alta importancia económica para la industria porcícola, debido a las pérdidas que causan y a los costos en medidas de control (Ellis, 2014).

El comercio internacional de cerdos reproductores y derivados de cerdo ha contribuido a la diseminación de genotipos de PCV que en principio se creían confinados a un lugar. La dinámica

en su circulación en el mundo se caracteriza por la prevalencia periódica de diversos genotipos, que posterior a diseminarse, son reemplazados por genotipos emergentes (Franzo *et al.*, 2016). Actualmente, se conocen 4 tipos de circovirus porcinos, PCV1, PCV2, PCV3 y PCV4 y diversos genotipos de PCV2 que difieren en su patogenicidad (Palinski *et al.*, 2017; Tischer *et al.*, 1982; Tischer *et al.*, 1986; Tischer *et al.*, 1974; Zhang *et al.*, 2020).

El PCV2 se considera el principal agente etiológico en diversas patologías conocidas en conjunto como enfermedades asociadas a Circovirus porcino (Gillespie *et al.*, 2009; Meehan *et al.*, 1998). Se conocen seis genotipos de PCV2, los cuales se diferencian en la secuencia codificante para la proteína Cap (Franzo *et al.*, 2015). Durante el 2016, se evaluó la prevalencia en la circulación de PCV2 en Estados Unidos, encontrándose que los genotipos PCV2a y PCV2b, que eran los más comunes, fueron reemplazados por el genotipo PCV2d. Éste, cuatro años antes había sido detectado como un novedoso genotipo mutante de PCV2b, con mayor virulencia a sus antecesores (Opriessnig *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2016). Recientemente, en México y Estados Unidos se detectó la circulación de una cepa denominada PCV2e (Harmon *et al.*, 2015) y en China durante el año 2018 se presentó la aparición de una nueva cepa de PCV2, denominada PCV2f (Bao *et al.*, 2018). En el mismo año, se evaluó la prevalencia de genotipos PCV2 en México, encontrándose que el 87.5% corresponde a infecciones por PCV2b (Bedolla López *et al.*, 2018). La circulación simultánea de diferentes genotipos de PCV2 en una región, posibilita la aparición de coinfecciones en cerdos. En casos de coinfección con diferentes genotipos de PCV2, puede presentarse recombinación genética y aumentar la virulencia de las cepas resultantes *in vitro*, así como una incrementada replicación del virus *in vivo* (Gerber *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2013).

Hasta hace pocos años, PCV2 era considerado como un patógeno exitosamente controlado mediante la vacunación. A la fecha, el rápido recambio en circulación y aparición de nuevos genotipos de PCV2, incluso más virulentos, pone en duda la eficacia en protección de las estrategias de vacunación actuales contra la infección por genotipos emergentes de PCV2.

2.8. Principales Antígenos del PCV2

El genoma de PCV2 posee 11 potenciales marcos de lectura abiertos (ORF), denominados ORF1 a ORF11 (Lv *et al.*, 2014). ORF1, ORF2 y ORF3 codifican, respectivamente, para las proteínas de replicación Rep, la proteína que forma la cápside del virión Cap y la proteína ORF3 involucrada en la patogenicidad del virus (Figura 3). La proteína Rep es considerada una proteína inmunogénica significativa de PCV2, con importancia en inmunidad mediada por células, para limitar la replicación de PCV2 y prevenir la progresión hacia enfermedades asociadas a PCV (Fort *et al.*, 2010).

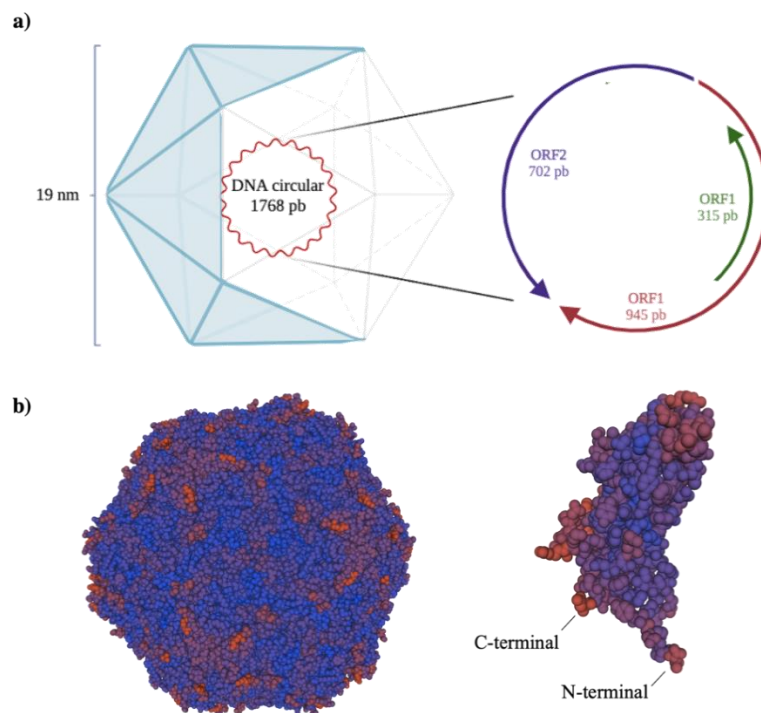


Figura 3. Características estructurales del Circovirus porcino. a) Organización estructural y arreglo del genoma de PCV2. b) Modelado de la cápside de PCV2a y subunidad capsómero realizado en Swiss-Model.

La proteína Cap se considera el marcador filogenético y epidemiológico más rentable del PCV2 (Olvera *et al.*, 2007). Es el único componente estructural de la cápside viral y el principal blanco del sistema inmune (Nawagitgul *et al.*, 2002). Los epítopes inmunogénicos de Cap, que son reconocidos por anticuerpos de cerdos infectados por PCV2, se encuentran determinados por las regiones A, B, C y D, las cuales corresponden a las secuencias de aminoácidos 65-87, 113-139,

169-183, y unos cuantos del extremo carboxilo terminal (Lekcharoensuk *et al.*, 2004). La variación en un solo aminoácido dentro de dichas regiones, resulta suficiente para evadir la actividad neutralizante de anticuerpos específicos a un genotipo determinado (Franzo *et al.*, 2016). Por último, la proteína ORF3 codificada por el ORF3, no es crucial en la replicación del virus, pero si importante en la patogénesis molecular de PCV2. Su localización dentro del núcleo de células infectadas lleva a cabo la inducción de la apoptosis, por activación de la vía de caspasas 3 y 8 (Lin *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2005). Así mismo, ORF3 juega un papel importante en el desarrollo de las lesiones patológicas por PCV2 (Karuppannan *et al.*, 2009). La apoptosis inducida por ORF3 conduce a la diseminación sistémica de PCV debido al reclutamiento de macrófagos, los cuales podrían acarrear partículas virales a los ganglios linfáticos incrementando la velocidad de diseminación del virus *in vivo* (Karuppannan & Kwang, 2011).

De entre los 3 antígenos más estudiados del PCV2, la proteína Cap es el antígeno predominante para el desarrollo de vacunas contra PCV2, dado que es la que se ha reportado como blanco principal de la respuesta inmune humoral y celular (Fort *et al.*, 2010; Nawagitgul *et al.*, 2002). Por lo tanto, considerando la capacidad de este antígeno para activar a linfocitos B y T (debido a la presencia de epítopes de linfocitos B y T), creemos que la Cap del PCV2 es un candidato apropiado para evaluar su efecto en la respuesta humoral y celular tras el direccionamiento de antígenos hacia DCs DEC205⁺ en cerdos.

3. HIPÓTESIS

El direccionamiento de la cápside del virus PCV2 hacia células dendríticas DEC205⁺ proporcionará inmunidad medida con la respuesta de células T y producción de anticuerpos anti-PCV2 en cerdos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar la respuesta celular y humoral promovida por el direccionamiento de la cápside de PCV2, hacia células dendríticas DEC205⁺ en cerdos.

4.2. Objetivos Particulares

- Diseñar y expresar los genes codificantes para la obtención de la proteína cápside de PCV2 (rCap) y el anticuerpo recombinante antiDEC205 unido a Cap (rAb-antiDEC205-Cap).
- Evaluar el reconocimiento e internalización del rAb-antiDEC205-Cap en células dendríticas DEC205⁺ de cerdo.
- Evaluar la respuesta humoral y celular inducida por la vacunación con rAb-antiDEC205-Cap en cerdos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Diseño de los Constructos de Expresión

Las secuencias del gen ORF2 del PCV2a codificante a la proteína Cap fueron obtenidas por el Laboratorio de Inmunología de CIAD. A.C. durante 2012, en el análisis de los genotipos de PCV2 circulantes en el estado de Sonora, México. Se utilizaron 2 variantes: la secuencia codificante a la proteína Cap completa (aminoácidos 1 al 233) y la versión truncada del antígeno Cap (tCap, aminoácidos 42-233), eliminando la secuencia de localización nuclear (aminoácidos 1-41). La versión tCap fue clonada en el vector de expresión pET28a (+) entre los sitios BamHI y XhoI para la producción en sistema de expresión procariota *E. coli* BL21 Gold (DE3).

El diseño del anticuerpo quimérico ratón x cerdo anti-DEC205 se realizó de acuerdo con lo descrito previamente por Bustamante-Córdova y colaboradores (2021). Brevemente, las secuencias codificantes para las regiones variables V_L y V_H del anticuerpo monoclonal (mAb) anti-DEC205 clona ZH9F7 se unieron a las secuencias codificantes para las regiones constantes C_L y C_H de un anticuerpo IgG1 de cerdo (*Sus scrofa*) obteniendo SwLC ZH9F7 y SwHC ZH9F7. Después de la tercera C_H del SwHC ZH9F7, colocamos la secuencia codificante de Cap y tCap para expresar las versiones del rAb ZH9F7 unidas a antígeno: rAb ZH9F7-Cap y rAb ZH9F7-tCap. Las secuencias SwLC ZH9F7, SwHC ZH9F7-Cap y rAb ZH9F7-tCap fueron clonadas en el vector de expresión pcDNA3.1(-) por GenScript entre EcoRI y HindIII. Adicionalmente, el constructo rAb ZH9F7 fue clonado en pcDNA3.1(+)-C-eGFP para obtener la versión del rAb ZH9F7 unido a la proteína verde fluorescente rAb ZH9F7-eGFP. Para la expresión del control de isotipo rAb 7DEU-tCap, se reemplazaron las regiones V_H y V_L del rAb ZH9F7 con las secuencias del mAb irrelevante obtenida del NCBI con acceso 7DEU_B reportado con capacidad neutralizante a SARS-CoV-2. De esta forma, se obtuvieron los genes SwLC 7DEU y SwHC 7DEU-tCap.

La figura 4 muestra una representación esquemática de los diferentes constructos de expresión clonados en pcDNA3.1(-), pcDNA3.1(+)-C-eGFP y pET28a(+).

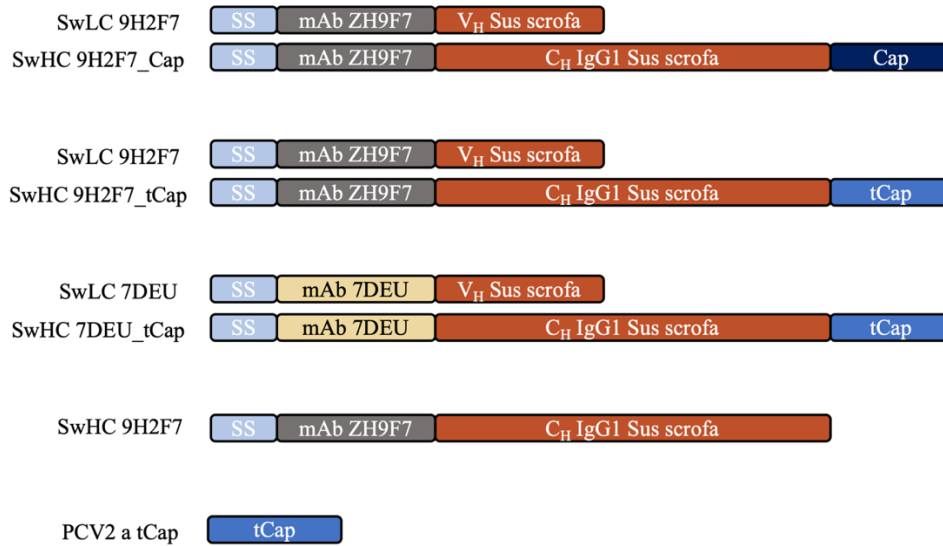


Figura 4. Representación esquemática de los diversos constructos para expresión del rAb ZH9F7-Cap, rAb ZH9F7-tCap, rAb 7DEU-tCap, rAb ZH9F7-eGFP y tCap de PCV2a.

5.2. Transformación de CQC *E. coli* TOP 10, *E. coli* BL21 Gold (DE3) y PCR de Colonia

La transformación de células químicamente competentes y análisis de colonias positivas por PCR se llevó a cabo según lo reportado previamente (Melgoza González, 2018). Brevemente, se agregaron 100 ng de los plásmidos codificantes en pcDNA3.1 o pET28a(+) a células químicamente competentes (CQC) *E. coli* TOP10 o *E. coli* BL21 Gold (DE3), respectivamente. Se dio choque térmico incubando el vial de bacterias en baño de agua a 42°C durante 30 segundos para después ser regresadas al hielo durante 2 min más. Después del choque térmico, se agregaron 250 µL de medio SOC y se incubó durante una hora a 37°C, en agitación orbital a 220 rpm. Al finalizar la incubación, se inocularon placas de medio Luria Broth (LB) suplementado con 100 µg/mL de ampicilina o kanamicina (según correspondiera), agregando 150 µL de bacterias transformadas y se realizó sembrado masivo con asa bacteriológica. Se incubaron las placas durante 24 h, a 37°C. Posterior al periodo de incubación, se identificaron y seleccionaron colonias aisladas para realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con el objetivo de encontrar aquellas positivas a la transformación con los plásmidos de expresión pcDNA3.1 o pET28a(+), según corresponda. Se llevó a cabo la preparación de la mezcla de reacción utilizando el equipo comercial Taq DNA Polymerase, recombinant de Invitrogen™, y se cargaron 25 µL por tubo de PCR. Para la carga del

templado, utilizando asa bacteriológica en punta, se tomó una porción de colonia bacteriana y se suspendió en la mezcla de reacción. Las cantidades de mezcla de PCR, protocolo de termociclador y los iniciadores empleados se describen en los cuadros 1, 2 y 3. La visualización del producto de PCR se realizó a través de electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, cargando 10 μ L de producto de PCR + 2 μ L de buffer de carga en cámara de electroforesis horizontal. La visualización de bandas en gel se realizó en equipo Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System with Image Lab™ de Bio-Rad.

Cuadro 1. Preparación de mezcla de reacción para PCR de colonia.

Reactivo	Volumen por reacción
Buffer PCR 10X	1.25 μ L
dNTP's 10 mM	0.25 μ L
MgCl ₂ 50 mM	0.75 μ L
Taq DNA Polimerasa	0.0625 μ L
Iniciador sentido 10 μ M	0.25 μ L
Iniciador antisentido 10 μ M	0.25 μ L
H ₂ O grado biología molecular	22.1875 μ L

Cuadro 2. Protocolo de termociclador para PCR de colonia de *E. coli* TOP10 o *E. coli* BL21 Gold (DE3) transformadas con plásmidos pcDNA3.1 o pET28a(+), respectivamente.

Temperatura	Tiempo	Numero de ciclos
94°C	3 min	1
94°C	30 s	25
61°C	1 min	25
72°C	2 min	25
72°C	10 min	1
10°C	∞	1

Cuadro 3. Iniciadores utilizados para la identificación de colonias *E. coli* TOP10 o *E. coli* BL21 Gold (DE3) positivas a la transformación con pcDNA3.1 o pET28a(+), respectivamente.

Primer	Secuencia	Blanco
pcDNA3.1 Fwd	5'-TAATACGACTCACTATAGGGAG-3'	Vector pcDNA3.1(+/-)
pcDNA3.1 Rev	5'-AGAAGGCACAGTCGAG-3'	Vector pcDNA3.1(+/-)
T7 Fwd	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	Vector pET28a(+)
T7 Rev	5'-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3'	Vector pET28a(+)

5.3. Expresión, Purificación y Caracterización de rAbs ZH9F7-Cap, rAb ZH9F7-eGFP, rAb ZH9F7-tCap y rAb 7DEU-tCap.

Una vez identificadas colonias *E. coli* TOP10 positivas a los pcDNA3.1(-)/SwLCZH9F7, pcDNA3.1(-)/SwHCZH9F7, pcDNA3.1(-)/SwHCZH9F7-Cap, pcDNA3.1(+)/rAbZH9F7-eGFP, pcDNA3.1(-)/SwHCZH9F7-tCap, pcDNA3.1(-)/SwLC7DEU y pcDNA3.1(-)/SwHC7DEU-tCap se llevó a cabo aislamiento de DNA plasmídico. Se seleccionó una colonia positiva a cada uno de los genes y se cultivó 150 mL de medio Luria Broth suplementado con ampicilina (100 ng/mL) durante 18 h a 37°C a 225 rpm. La extracción de DNA plasmídico se realizó empleando el equipo ZymopureII Plasmid Maxiprep de Zymo research siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para producir los anticuerpos recombinantes, se utilizó el sistema de expresión Expi293 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La transfección con los plásmidos codificantes fue realizada siguiendo los protocolos del fabricante. Brevemente, 7.5×10^7 Expi293 fueron sembradas en un matraz con 25.5 mL de medio de expresión Expi293. Posteriormente, se llevó a cabo la preparación de los complejos de transfección utilizando 30 µg de los plásmidos codificantes para las cadenas pesadas y ligeras de los diferentes anticuerpos quiméricos (relación 1:2) y 81 µL del reactivo de transfección Expifectamine, ambos diluidos en medio Opti-MEM I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Las células transfectadas fueron incubadas a 37°C, 8% CO₂, y 125 rpm. Veintidós horas post-transfección, los potenciadores 1 y 2 fueron agregados a los matraces del cultivo.

Diariamente se llevó a cabo la determinación de la viabilidad por exclusión con tinción en azul de tripán (Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA). Los cultivos transfectados fueron cosechados 4 días post transfección y los sobrenadantes fueron clarificados por centrifugación a 493 x g durante 10 min. Una vez clarificados, se llevó a cabo la purificación de los anticuerpos de interés utilizando columnas HiTrap Protein G HP (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante (Buffer de unión fosfato de sodio 20 mM, pH 7.0; buffer de elución glicina-HCl 0.1 M, pH 2.7). Durante la elución, se colectaron fracciones de 1 mL las cuales fueron recuperadas en buffer colector (Tris-HCl 1M, pH 9.0) y posteriormente analizadas por SDS-PAGE al 10% seguido de tinción con azul de Coomassie (Bio-Rad).

Complementariamente, la caracterización de los anticuerpos purificados se llevó a cabo por

western blot. Después del SDS-PAGE, se llevó a cabo transferencia a membrana de PVDF la cual fue bloqueada usando PBST (Buffer de fosfatos salino “PBS” 1X pH 7.4 al 0.05% de Tween-20) con 5% de leche en polvo reducida en grasa. El bloqueo se realizó durante toda la noche a 4°C. Al completar el bloqueo, se realizó un lavado con PBST y se agregó anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG (H+L) de cerdo conjugado con HRP diluido 1:5,000 en PBST. La membrana fue incubada por 1 h a 37°C en agitación y posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBST. Finalmente, se llevó a cabo el revelado tras la adición del sustrato cromogénico 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma, St Louis, MO, USA).

5.4. Expresión, Purificación y Caracterización de tCap en *E. coli* BL21 Gold (DE3)

Después de llevar a cabo la identificación de colonias positivas a la transformación por PCR de colonia, se seleccionó una colonia aislada positiva para llevar a cabo la preparación de un pre-inóculo en 20 mL de medio fresco Luria Broth suplementado con kanamicina (100 ng/mL) el cual fue incubado por 16 h a 37°C a 220 rpm. Transcurrido el periodo de incubación, 10 mL de pre-inóculo fueron utilizados para realizar un escalamiento en la expresión e inocular 1000 mL de medio fresco LB con kanamicina. Los matracas de cultivo fueron incubados a 37°C, a 220 rpm hasta que la densidad óptica alcanzó un valor entre 0.6 y 0.8, leída a 600 nm. En ese punto, se llevó a cabo la inducción en la expresión agregando IPTG a una concentración final de 0.2 mM. El cultivo celular fue cosechado por centrifugación a 8,000 x g a 4°C, durante 30 min.

Subsecuentemente, 1 gramo del botón bacteriano se suspendido en 4 mL de buffer de lisis TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). La suspensión de bacterias fue sonicada en baño de hielo aplicando 6 pulsos de 10 s, amplitud de 40%. Una vez sonicadas, se tomó la fracción soluble centrifugando a 16 x g, 4 °C por 30 min. El sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de 0.22 µm y cargado en una columna de cromatografía en metales inmovilizados (IMAC) HisTrap HP de 1 mL (Cytiva). La elución se llevó a cabo usando el equipo ÄKTAprime plus, a través de un gradiente de elución de 0 al 100% de buffer de elución B (Buffer A: 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 7.4; Buffer B: 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7.4). Fracciones de 1 mL fueron colectadas y analizadas por SDS-PAGE al 12% seguido de tinción

con azul de Coomassie.

Después de la visualización de productos en la tinción azul de Coomassie, se llevó a cabo un western blot. Para ello, posterior a completar el SDS-PAGE, se llevó a cabo transferencia a membrana de PVDF la cual fue posteriormente bloqueada usando PBST al 5% de leche reducida en grasa, a 4°C toda la noche. Al finalizar el bloqueo, se realizó un lavado con PBST y se agregó anticuerpo monoclonal anti-poli-histidina conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich), diluido 1:2,000 en PBST. La membrana fue incubada por 1 h a 37°C en agitación y posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBST. Finalmente, se reveló tras la adición del sustrato de fosfatasa alcalina SIGMAFAST™ BCIP®/NBT (Sigma-Aldrich).

Una vez confirmada la expresión del antígeno tCap del PCV2a en el sistema *E.coli* BL21 Gold (DE3) se removió la endotoxina utilizando el equipo comercial ToxinEraser Endotoxin Removal kit (GenScript), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los niveles remanentes fueron cuantificados con el equipo comercial ToxinSensor Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (GenScript) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para confirmar que el antígeno purificado conservara su antigenicidad, se realizó un western blot, en el que después del bloqueo (previamente descrito), se incubó la membrana 1 h, a 37°C con un suero policlonal de cerdo anti-PCV2, diluido 1:200 en PBST. Después de la incubación se realizaron 3 lavados con PBST y seguido de ello, se agregó un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG (H+L) de cerdo conjugado con HRP, diluido 1:5,000 en PBST. Se incubó nuevamente 1 h a 37°C en agitación y después se realizaron 3 lavados adicionales. Finalmente, se agregó sustrato TMB para membrana para visualizar la banda de interés.

5.5. Animales

Cerdos clínicamente sanos fueron incluidos en este estudio y obtenidos de granjas libres de PRRSV y de virus de Influenza, así como sin historial de PCV2. Cerdos convencionales (hembras y machos) de 3-4 semanas de edad fueron recibidos. Los animales fueron alojados en la granja experimental del Laboratorio de Inmunología de CIAD A. C., con acceso a agua y alimento *ad libitum*. Los protocolos aplicados fueron aprobados por el Comité de Ética de CIAD. Al final de

los ensayos, los cerdos fueron sacrificados siguiendo las recomendaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres.

5.6. Evaluación del Tiempo de Vida Media del rAb ZH9F7 en Circulación Sanguínea

Para evaluar el tiempo de la vida media de rAb ZH9F7 en circulación sanguínea, cuatro cerdos sanos recibieron una dosis única de rAb ZH9F7 (200 µg/kg de peso corporal), aplicado vía parenteral en la vena de la oreja después de anestésiar con diazepam (1 mg/kg) y ketamina (10 mg/kg). Se tomaron muestras de sangre periférica antes de la aplicación (tiempo 0), a las 8 y 24 h, y posteriormente a los 2, 4, 8, 11 y 14 días después de la aplicación.

La presencia del rAb ZH9F7 en suero fue evaluada por ELISA. Para ello, placas de ELISA de 96 pozos fueron recubiertas con el dominio extracelular (ECD) del receptor DEC205 porcino a una concentración de 2 µg/mL en buffer de carbonatos (100 mM, pH 9.6). Las placas fueron fijadas toda la noche a 4°C. Después de la incubación, las placas fueron bloqueadas con PBST al 5% de leche reducida en grasa e incubadas a temperatura ambiente por 2 h. Los sueros de cerdo fueron diluidos 1:50 en PBS y 100 µL de las muestras diluidas fueron agregadas a los pozos de la placa (por triplicado) e incubadas a temperatura ambiente por 1 h. Después del periodo de incubación, se realizaron lavados con PBST y se agregó el anticuerpo de detección de cabra anti-IgG (H+L) de cerdo, conjugado con HRP (diluido 1:2500 en PBST). Se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Después, se reveló agregando 50 µL del reactivo TMB a cada pozo y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, la reacción colorimétrica se detuvo agregando 50 µL de H₂SO₄ 2 N por pozo y la densidad óptica fue medida a 450 nm en lector de microplacas ELISA.

5.7. Aislamiento de Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMCs)

Todos los experimentos de reconocimiento de células DEC205⁺, internalización y estimulación

fueron realizados utilizando células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Se tomaron muestras de sangre porcina por venopunción las cuales fueron colectadas en tubos con EDTA. Posteriormente, las PBMCs fueron aisladas por gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque plus (GE Healthcare, Plainfield, NJ, USA). Para ello, 4 mL de sangre con EDTA fueron cuidadosamente colocadas en tubo Falcon de 15 mL con 8 mL de reactivo Ficoll-Paque® plus, utilizando una relación sangre-Ficoll de 1:2. Después, los tubos fueron centrifugados a 493 x g durante 30 min sin freno. Al concluir la centrifugación, la capa de PBMCs fueron cuidadosamente removidas y lavadas dos veces con RPMI-1640 (Sigma–Aldrich) completo (suplementado con penicilina-estreptomicina 100 unidades/mL y 100 µg/mL, respectivamente; 0.5 µg/mL de anfotericina B; 50 µg/mL gentamicina y 10% de suero fetal bovino) con 2 mM de EDTA. Finalmente, las células fueron suspendidas en medio RPMI-1640 completo hasta que los ensayos fueran realizados.

5.8. Evaluación de la Internalización Mediada por Receptor con rAb ZH9F7

Para evaluar la endocitosis mediada por receptor después del acoplamiento del rAb ZH9F7 a DEC205, realizamos un experimento de internalización en PBMCs de cerdo evaluado por citometría de flujo. Para ello, 1 mg de rAb ZH9F7 fue biotinilado con el reactivo comercial EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Después, las PMBCs de cerdo fueron bloqueadas con 10% de suero de cerdo en PBA (PBS 1X pH 7.4 al 0.1% de albúmina sérica bovina). Después del bloqueo, 1×10^6 células se incubaron con 0.1 µg del rAb ZH9F7 biotinilado a temperatura ambiente, 15 min. Después de realizar 2 lavados con PBA, las PBMCs fueron incubadas por 30 o 60 min a 37°C para permitir la internalización del complejo rAb ZH9F7-DEC205. Como control se mantuvieron células en hielo por 30 o 60 min para evaluar el desacoplamiento (de ser viable) del anticuerpo con el receptor, respecto al tiempo.

Después de los tiempos de incubación con rAb ZH9F7, las células fueron lavadas y se agregaron los anticuerpos anti-CD14 (IgG2b de ratón), anti-CADM1 (IgY de gallina) y anti-CD172 (IgG1 de ratón) y se realizó una incubación por 15 min a 4°C. Al concluir el periodo de incubación las células fueron lavadas 2 veces con PBA. Finalmente, se agregaron los anticuerpos secundarios cabra anti-

IgG2b de ratón conjugado con Isotiocianato de fluoresceína (FITC, Southern Biotech), cabra anti-IgY de gallina conjugado con Alexa Fluor-647 (Invitrogen), cabra anti-IgG1 de ratón conjugado con Violeta Brillante-421 (BV-421, BioLegend) y estreptavidina conjugada con R-Ficoeritrina (RPE, Southern Biotech). Las células se incubaron 15 min a 4°C y posteriormente se lavaron 2 veces más con PBA. Finalmente, las células fueron suspendidas en PBA y analizadas por citometría de flujo.

5.9. Reconocimiento de Células DEC205⁺ *In Vivo* por rAb ZH9F7 y rAb ZH9F7-tCap.

Para evaluar la capacidad de los anticuerpos recombinantes anti-DEC205 para reconocer DCs DEC205⁺ en órganos linfoides y no linfoides, el rAb ZH9F7, rAb ZH9F7-tCap y rAb 7DEU-tCap (control de isotipo) fueron conjugados químicamente con RPE, utilizando el kit de conjugación rápida LYNX Rapid RPE Antibody Conjugation (Bio-Rad). Posteriormente, 60 µg de rAb conjugado con RPE + 100 µg de adyuvante poly (I:C) (InvivoGen) fueron mezclados y diluidos en PBS estéril en un volumen final de 600 µL. Las formulaciones fueron inyectadas por vía intradérmica utilizando una aguja hipodérmica en el área inguinal derecha de 3 cerdos sanos por grupo. Como control negativo, 3 cerdos sanos fueron inyectados con una formulación de PBS y poly (I:C). Después de 24 h, los cerdos fueron sometidos a eutanasia por sensibilización por choque eléctrico seguido de exanguinación bajo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014. Después de la asepsia de las regiones inguinales, fueron tomadas biopsias de piel de ambos lados (derecho e izquierdo).

Las biopsias de piel fueron cultivadas en medio RPMI-1640 completo suplementado con colagenasa D (1 mg/mL) y dispasa (0.5 mg/mL) e incubadas a 37°C en atmósfera de 8% de CO₂ durante 22 h. Las células migratorias de la piel en el sobrenadante del cultivo fueron cosechadas y filtradas a través de una malla de nylon de 100 µm. Después de contar las células cosechadas, 500 x10³ células migratorias fueron bloqueadas con PBA al 10% de suero porcino y teñidas con anti-CD163 (IgG1 de ratón, Bio-Rad) y anti-CADM1 (IgY de gallina, MBL International) por 15 min a temperatura ambiente. Al concluir el periodo de incubación, las células fueron lavadas y se agregaron los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón conjugado con BV-421 (BioLegend), anti-

IgY conjugado con Alexa Fluor-647 (Invitrogen), anti-CD172a conjugado con FITC (Bio-Rad) y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. Al finalizar la tinción, las células fueron suspendidas en PBA y analizadas por citometría de flujo.

De manera complementaria al análisis de las células migratorias en los explantes de piel, se extirparon los ganglios linfáticos inguinales superficiales después de la necropsia, macerados a través de un colador de malla de nylon con poro de 100 μm y las células se colectaron en medio RPMI-1640 completo. Posteriormente, se realizó un enriquecimiento de DCs por gradiente de densidad Opti-prep, siguiendo las modificaciones previamente establecidas por Puebla Clark y colaboradores (2019). De manera breve, se siguió el protocolo descrito por el fabricante, el cual fue modificado usando medio RPMI-1640 para diluir iodixanol al 11.5%, y la solución de suspensión fue reemplazada por solución salina equilibrada de Hank's suplementada con 5% de SFB y 2 mM de EDTA (Puebla-Clark *et al.*, 2019).

Una vez obtenida la suspensión de células de ganglios linfáticos, se realizó el bloqueo con PBA al 10% de suero de cerdo. Después, 3×10^6 células fueron teñidas con anti-CD3 (IgG1 de ratón), anti-CD21 (IgG1 de ratón) y anti-CADM1 (IgY) a temperatura ambiente por 15 min. Después de la incubación se realizaron 2 lavados con PBA, seguidos de la adición de anticuerpos anti-IgG1 conjugado con BV-421 y anti-IgY conjugado con Alexa Fluor-647. Se incubó a temperatura ambiente durante 15 min seguido de 2 lavados con PBA. En un paso final de tinción se agregó anti-CD163 (IgG1 de ratón) conjugado con Alexa Fluor-488 y se incubó una vez más bajo las mismas condiciones.

5.10. Evaluación del Reconocimiento *In Situ* de Células DEC205⁺ por Microscopía Confocal

Para visualizar las células teñidas *in situ* con el rAb ZH9F7 anti-DEC205, se aplicaron vía intradérmica 60 μg de rAb ZH9F7-eGFP en combinación con 100 μg de poly (I:C). Transcurridas 6 h después de la aplicación, se tomaron biopsias de piel del sitio de la aplicación con la ayuda de un punzón de biopsia de 8 mm de diámetro. Las biopsias fueron fijadas con formaldehído, procesadas para su inclusión y corte en parafina. Se realizaron cortes de 5 μm de grosor los cuales se colocaron en portaobjetos de vidrio cargadas positivamente. El exceso de parafina fue removido

incubando las laminillas a 70°C por 40 min. Los cortes fueron rehidratados con una solución de solventes xileno-etanol.

La recuperación de antígenos se realizó usando buffer de citrato (citrato de sodio 10 mM, pH 6.0) a 120°C durante 20 min. Las secciones de piel fueron permeabilizadas y bloqueadas por 2 h con solución de permeabilización (10 mg/mL de albúmina sérica bovina, 5% de suero de caballo, 0.02% de azida de sodio y 0.3% de Tritón-100). Después de la permeabilización, las muestras fueron teñidas con el anticuerpo anti-CADM1 seguido de 18 h a 4°C dentro de una cámara húmeda. Luego de la incubación, se agregaron los anticuerpos anti-IgY conjugado con Alexa Fluor-647 y anti-CD172a de cerdo (IgG1 de ratón) conjugado con R-PE. Se incubaron las muestras durante 2 h en cámara húmeda y en oscuridad. Finalmente, se realizó la tinción de núcleos con Hoechst durante 10 min. Las laminillas fueron montadas con Vectashield y almacenadas a 4°C. Las imágenes fueron obtenidas en microscopio confocal invertido Nikon Ti Eclipse (Nikon Corporation) usando NIS Elements v.4.50. La obtención de imágenes se realizó utilizando una lente de objetivo de 20 x (seco, NA 0,8). La evaluación se realizó a 3.4 x y se utilizó el zoom digital. Las imágenes se analizaron con el software FIJI ImageJ.

5.11. Evaluación de la Respuesta Inducida por el Direcccionamiento de rAb ZH9F7-tCap

Para determinar si el direccionamiento de antígeno tCap de PCV2 hacia las DCs a través del sistema rAb ZH9F7-tCap puede activar la respuesta inmune celular, cerdos de ocho semanas de edad fueron vacunados intradérmicamente con el rAb ZH9F7-tCap (dosis equivalente a 100 µg de Cap) más 100 µg de poly (I:C) en el área inguinal derecha. El grupo control (n=2) fue conformado por cerdos de la misma edad quienes no recibieron ninguna vacuna. Tres semanas después de la aplicación de la primera vacuna se llevó a cabo un refuerzo por la misma vía y dosis de aplicación. Finalmente, una semana después del refuerzo, se tomaron muestras de sangre periférica colectadas en tubos con EDTA, con el objetivo de evaluar la respuesta de células secretoras de IFN- γ en PBMCs. Además, muestras de suero fueron obtenidas al inicio del experimento (tiempo 0) y una semana después de la aplicación del refuerzo para analizar la respuesta de anticuerpos IgG totales contra la Cap de PCV2a. Antes de la inmunización, los cerdos presentaron bajos niveles de anticuerpos anti-PCV2, los cuales fueron determinados por ELISA (absorbancia menor a 0.200).

5.12. Evaluación de Respuesta de Linfocitos T CD4 α^+ y CD8 α^+ Productores de IFN- γ

Para evaluar la producción de IFN- γ *in vitro*, PBMCs fueron aisladas por gradiente de densidad en Ficoll (descrito previamente). Para la estimulación de IFN- γ , 1×10^6 células fueron sembradas en placas de 48 pozos con 500 μ L de RPMI 1640 (Sigma–Aldrich) completo, 2-mercaptoetanol (Sigma–Aldrich) con 10 μ g/mL de fitohemaglutinina (PHA, Sigma–Aldrich), rAb ZH9F7-tCap (36 μ g/mL equivalente a 10 μ g/mL Cap), rAb ZH9F7 como control (26 μ g/mL) y medio de cultivo sin estímulo. Después, las células fueron incubadas a 37°C, 5% de CO₂ durante 8 h. Al concluir el periodo de incubación, se agregó el cóctel inhibidor de transporte de proteínas eBioscience™ (500X, Invitrogen) a concentración final 1X. Las células fueron incubadas por 16 h más bajo las condiciones antes mencionadas.

Una vez terminada la estimulación, se realizó la cosecha de las células para posteriormente ser bloqueadas con PBA al 10% de suero de cerdo. Para la tinción extracelular se agregaron los anticuerpos de ratón anti-CD8 α (IgG2a, Bio-Rad) y el anticuerpo anti-CD4 α de cerdo (IgG2b, Bio-Rad) y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. Después de realizar 2 lavados, se agregaron los anticuerpos de detección secundarios anti-IgG2a conjugado con FITC y anti-IgG2b conjugado con Alexa Fluor-647 y se incubó 15 min a temperatura ambiente. Una vez realizada la tinción extracelular, las células fueron fijadas y permeabilizadas con el kit Leucoperm (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de dicho tratamiento, se llevó a cabo la tinción de IFN- γ intracelular, agregando el anticuerpo de ratón anti-IFN- γ de cerdo, conjugado con PE. Finalmente, las células fueron adquiridas en el citómetro FACS Aria III (BD) y analizadas en el Software FACS Diva Software versión 8.0.1 (BD). El porcentaje de IFN- γ intracelular producido por las células sin estimular fue sustraído de las muestras estimuladas para eliminar la producción de IFN- γ basal.

5.13. Adquisición por Citometría de Flujo y Análisis

Todos los experimentos fueron adquiridos en el citómetro de flujo FACS Aria III (BD Biosciences)

y analizados utilizando el Software FACS Diva versión 8.0.1 (BD Biosciences). En la mayoría de los experimentos, por lo menos 5×10^5 células fueron teñidas y adquiridas. En el cuadro IV se resumen los anticuerpos y diluciones utilizados en los ensayos de citometría.

Anticuerpo	Casa comercial	Dilución
Anti CD163 (IgG1 murino)	Bio-Rad, UK	1:100
Anti CD172a (IgG1 murino)	Bio-Rad, UK	1:100
Anti CADM1 (IgY de gallina)	MBL International, USA	1:500
Anti CD14 (IgG2b murino)	Bio-Rad, UK	1:200
Anti CD3 (IgG1 murino)	Southern Biotech, USA	1:100
Anti CD21 (IgG1 murino)	Southern Biotech, USA	1:200
Anti CD8 α (IgG2a murino)	Bio-Rad, UK	1:200
Anti CD4 α (IgG2b murino)	Bio-Rad, UK	1:100
Anti DEC205 (ratón x cerdo IgG1)	Fabricación propia	1:100
Estreptavidina-RPE	Southern Biotech, USA	1:100
Anti-IgG1 conjugado conBV421	BioLegend, USA	1:100
Anti-IgY conjugado con Alexa Fluor-647	Invitrogen, USA	1:500
Anti-IgG2b conjugado con FITC	SouthernBiotech, USA	1:100
Anti-IgG2b conjugado con Alexa Fluor-647	Invitrogen, USA	1:200
Anti-IFN- γ porcino conjugado con RPE	BD Pharmingen, USA	Sin diluir

5.14. Determinación de Respuesta Humoral Estimulada por el rAb ZH9F7-tCap

La respuesta humoral inducida por la inmunización con el rAb ZH9F7-tCap fue evaluada por ELISA indirecto. Brevemente, placas de ELISA de alta adherencia fueron recubiertas con el antígeno recombinante tCap expresado en *E. coli* (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), la cual fue diluida en buffer de carbonatos (100 mM, pH 9.6) a 4°C durante toda la noche. Después de la incubación, la placa se lavó una vez con PBS 1X. Luego la placa fue bloqueada durante 1 h a temperatura ambiente con 2% de albumina sérica bovina en PBST. Las muestras de suero porcino fueron diluidas 1:100 en PBS con 25% de suero de cabra, y 50 μL de la dilución fueron agregados a los pozos de la placa de ELISA por triplicado. Las muestras fueron incubadas por 30 min a temperatura ambiente con agitación suave. Al concluir el periodo de incubación, las muestras fueron lavadas 5 veces con PBST. Acto seguido, se agregaron 50 μL de anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) de cerdo

conjugado con HRP (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) el cual se diluyó en PBST (1:5000). Nuevamente se llevó a cabo la incubación durante 30 min a temperatura ambiente y agitación constante. Se realizaron 5 lavados con PBST y se agregaron 50 μ L de TMB a cada pozo de la placa. Después de 5 min de incubación en la oscuridad, a temperatura ambiente, 50 μ L de H_2SO_4 2N fueron agregados para detener la reacción colorimétrica. Finalmente, la densidad óptica de las muestras fue leída en un lector de microplaca a 450 nm.

5.15. Análisis Estadísticos

Todos los análisis y gráficas fueron realizados en el software GraphPad Prism versión 9.0. La normalidad de los datos fue determinada utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una y dos vías (cuando sea indicado) para evaluar las diferencias entre las medias de los tratamientos, seguido de comparación múltiple de medias por la prueba de Tukey-Kramer. Significancias estadísticas fueron consideradas tomando un valor de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Identificación de Colonias Positivas a los Constructos de Expresión

Una vez que se llevó a cabo el análisis de PCR de colonia de *E. coli* TOP10 transformadas con SwHCZH9F7-Cap, SwLCZH9F7 y SwHCZH9F7-eGFP, se identificaron clonas que fueron positivas a los productos esperados, con extensiones de 2267 pb, 860 pb y 2266 pb, respectivamente (figura 5). Como alternativa para la expresión del anticuerpo acoplado a la versión truncada del antígeno Cap, se diseñaron los constructos codificantes a la cadena pesada SwHCZH9F7 y control de isotipo SwHC7DEU fusionados genéticamente con tCap. Posterior al análisis por electroforesis en agarosa, se identificaron bandas con extensión de alrededor de 2225 pb y 2123 pb, codificantes para las cadenas SwHCZH9F7-tCap y SwHC7DEU-tCap, respectivamente. Además, se visualizaron los productos de PCR de los respectivos genes codificantes para las cadenas ligeras SwLCZH9F7 y SwLC7DEU con extensión de 860 y 873 pares de bases (pb) respectivamente (figura 6). Finalmente, en la transformación de la cepa de expresión procariota *E. coli* BL21 Gold (DE3) se identificaron varias colonias positivas al constructo de expresión tCap, el cual posee una extensión de 858 pb (figura 7).

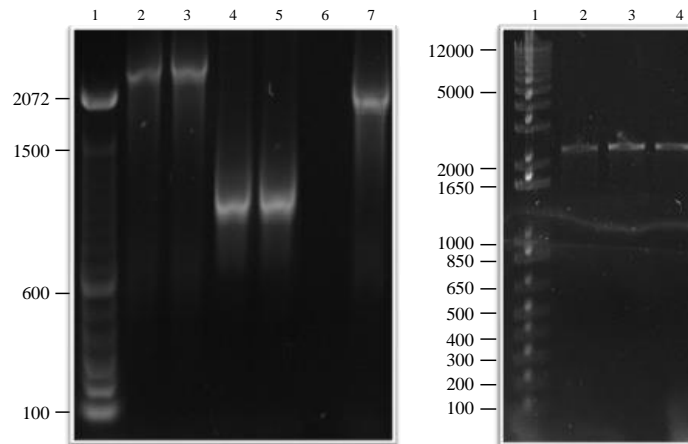


Figura 5. Análisis de productos de PCR de colonias de *E. coli* TOP10 transformadas con pcDNA3.1(-)/SwHCZH9F7-Cap, pcDNA3.1(-)/SwLCZH9F7 y pcDNA3.1(+)/SwHCZH9F7-eGFP. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. A la izquierda: línea 1, marcador de peso molecular de 100 pb; línea 2, colonia 1 pcDNA3.1(-)/SwHCZH9F7-Cap; línea 3, colonia 2 pcDNA3.1(-)/SwHCZH9F7-Cap; línea 4, colonia 1 pcDNA3.1(-)/SwLCZH9F7; línea 5, colonia 2 pcDNA3.1(-)/SwLCZH9F7; línea 6, control negativo; línea 7, control positivo. A la derecha: línea 1, marcador de peso molecular de 1 kb plus; línea 2, colonia 1 pcDNA3.1(+)/SwHCZH9F7-C-eGFP; línea 3, colonia 2 pcDNA3.1(+)/SwHCZH9F7-C-eGFP; línea 4, colonia 3 pcDNA3.1(+)/SwHCZH9F7-C-eGFP.

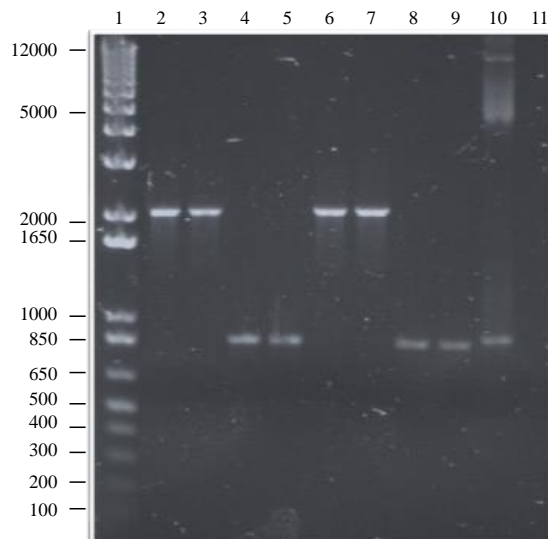


Figura 6. Análisis de productos de PCR de colonias de *E. coli* TOP10 transformadas con pcDNA3.1(-)/SwHCZH9F7-tCap y pcDNA3.1(-)/7DEU-tCap. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. Línea 1, marcador de peso molecular de 1 kb plus; línea 2, colonia 1 pcDNA3.1(-)/SwHCZH9F7-tCap; línea 3, colonia 2 pcDNA3.1(-)/SwHCZH9F7-tCap; línea 4, colonia 1 pcDNA3.1(-)/SwLCZH9F7; línea 5, colonia 2 pcDNA3.1(-)/SwLCZH9F7; línea 6, colonia 1 pcDNA3.1(-)/SwHC7DEU-tCap; línea 7, colonia 2 pcDNA3.1(-)/SwHC7DEU-tCap; línea 8, colonia 1 pcDNA3.1(-)/SwLC7DEU; línea 9, colonia 2 pcDNA3.1(-)/SwLC7DEU; línea 10, control positivo; línea 11 control negativo.

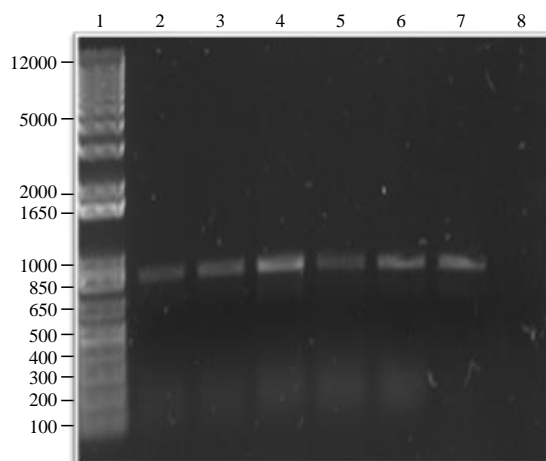


Figura 7. Análisis de productos de PCR de colonias de *E. coli* BL21 Gold (DE3) transformadas con pET28a(+)/tCap. Línea 1, marcador de peso molecular de 1 kb plus; línea 2, colonia 1 pET28a(+)/tCap; línea 3, colonia 2 pET28a(+)/tCap; línea 4, colonia 3 pET28a(+)/tCap; línea 5, colonia 4 pET28a(+)/tCap; línea 6, colonia 5 pET28a(+)/tCap; línea 7, control positivo; línea 8, control negativo.

6.2. Expresión de rAb ZH9F7-Cap, rAb ZH9F7-eGFP, rAb ZH9F7-tCap y rAb 7DEU-tCap

Después de que las células Expi293f fueron transfectadas, el monitoreo de la viabilidad se llevó a cabo diariamente hasta que las células fueron cosechadas en el día 4 post-transfección, cuando el porcentaje de células viables fue alrededor del 60%. La figura 8 muestra los productos obtenidos de los anticuerpos rAb ZH9F7-Cap y rAb ZH9F7-eGFP purificados por Proteína G. En el caso de los productos de la purificación del rAb ZH9F7-eGFP, se observan dos bandas predominantes las cuales corresponden a la cadena ligera y pesada unida a la proteína eGFP con pesos deducidos de 25.7 kDa y 80.2 kDa, respectivamente. La purificación se confirmó tras la inmunodetección de las regiones porcinas del anticuerpo quimérico ratón x cerdo, por Western blot.

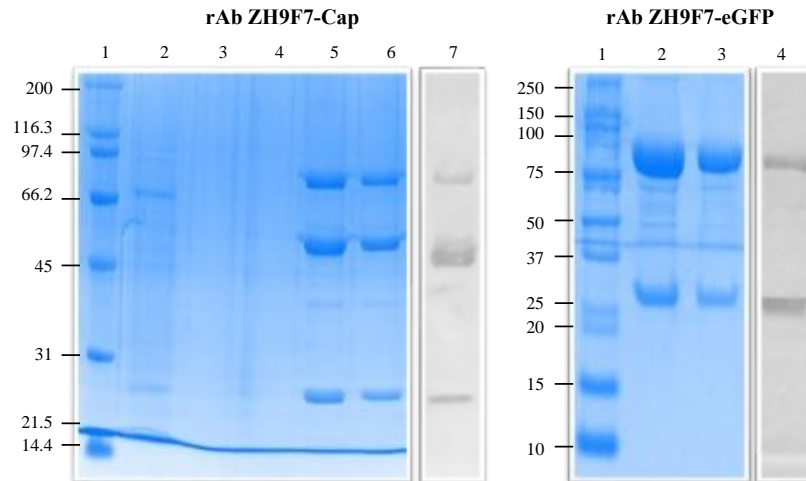


Figura 8. Anticuerpos rAb ZH9F7-Cap y rAb ZH9F7-eGFP expresados en Expi293F y purificados. Imagen izquierda SDS-PAGE seguido de tinción con azul de Coomassie (líneas 1-6): línea 1, marcador de peso molecular de 200 kDa; línea 2, post-columna; línea 3, fracción 1 elución rAb ZH9F7-Cap; línea 4, fracción 2 elución rAb ZH9F7-Cap; línea 5, fracción 3 elución rAb ZH9F7-Cap; línea 6, fracción 4 elución rAb ZH9F7-Cap; línea 7, western blot empleando anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) de cerdo conjugado con HRP. Imagen derecha SDS PAGE seguido de tinción con azul de Coomassie (líneas 1-3): línea 1, marcador de peso molecular de 250 kDa; línea 2, fracción 4 elución rAb ZH9F7-eGFP; línea 3, fracción 5 elución rAb ZH9F7-eGFP; línea 4, Western blot empleando anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) de cerdo conjugado con HRP.

Por otro lado, en los productos obtenidos de la expresión del rAb ZH9F7 acoplado al antígeno completo Cap de PCV2a, se encontraron 3 bandas con pesos estimados de 25 kDa, 50 kDa y 80 kDa. Para esta expresión, las bandas esperadas de las cadenas ligera y pesada unida al antígeno Cap, correspondían a 25 kDa y 80 kDa, respectivamente. Sin embargo, la banda adicional no esperada de 50 kDa que presentó una proporción mayor respecto a la banda de 80 kDa, también fue reconocida por el anticuerpo anti-IgG (H+L) de cerdo, lo cual refleja la producción parcial de la cadena pesada sin antígeno. Aunque solo pretendimos producir la cadena pesada fusionada con el antígeno Cap, se expresó parcialmente la cadena pesada sin el antígeno. Esta situación se ha observado por otros autores en la producción de un anti-DEC205 genéticamente conjugado con ovoalbúmina, aunque predominó la proporción de cadena pesada unida a antígeno (Neubert *et al.*, 2014).

La proteína Cap de PCV2 cuenta con una secuencia de localización nuclear en el extremo N-terminal, rica en arginina, la cual después de ser traducida la dirige al núcleo de la célula infectada donde se lleva a cabo el empaquetamiento y ensamblaje de nuevas partículas de PCV2 (Hou *et al.*, 2018). Considerando que se incluyó la secuencia codificante a la versión completa de la proteína

Cap unida a la cadena SwHC ZH9F7, hipotetizamos que esta secuencia señal interna podría estar generando conflicto durante la traducción de la proteína. Para comprobarlo, se expresó la versión truncada del antígeno Cap (tCap), la cual carece de la secuencia N-terminal (aminoácidos 1-41) por lo que se diseñaron nuevamente los genes de expresión. En la figura 9 podemos ver los productos de la purificación del anticuerpo rAb ZH9F7-tCap. De esta forma se lograron visualizar 2 bandas predominantes con peso aproximado a 25 kDa y 74.5 kDa y otras de menor intensidad de peso cercano a 50 kDa. Cuando se evaluó mediante Western blot, se confirmó que las bandas corresponden al anticuerpo ratón x cerdo, e incluso que las bandas de 50 kDa representan la versión de cadena pesada sin antígeno, ahora en menor proporción. Por lo anterior, se tomó la decisión de trabajar con la versión truncada, cuya expresión unida a la cadena pesada fue más eficiente que la versión completa Cap de PCV2a. En una etapa final, como control de isotipo, se generó una variante del anticuerpo ratón x cerdo en el cual, las regiones V_H y V_L del anticuerpo rAb ZH9F7-tCap fueron reemplazadas por las regiones variables V_H y V_L de un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo rAb 7DEU-tCap. En la figura 9 se observan los productos de purificación del control irrelevante isotipo unido a tCap lo cual se confirmó por Western blot.

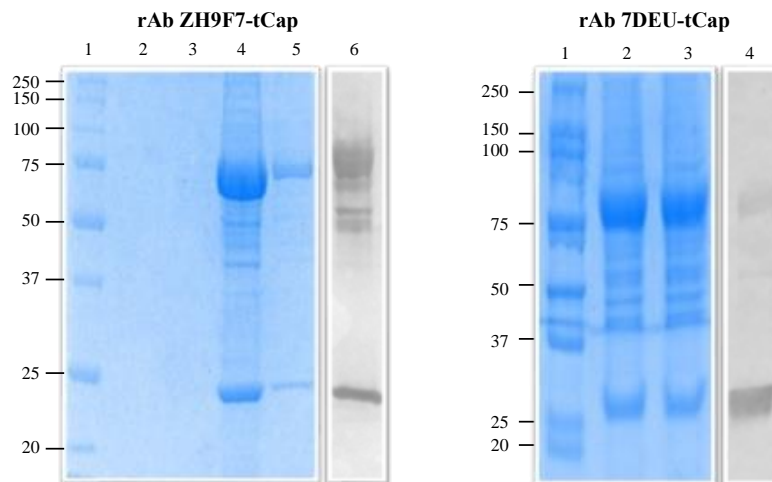


Figura 9. Anticuerpos rAb ZH9F7-tCap y rAb 7DEU-tCap expresados en Expi293F y purificados. Imagen izquierda SDS-PAGE seguido de tinción con azul de Coomassie (líneas 1-5): línea 1, marcador de peso molecular de 250 kDa; línea 2, fracción 1 elución rAb ZH9F7-tCap; línea 3, fracción 2 elución rAb ZH9F7-tCap; línea 4, fracción 3 elución rAb ZH9F7-tCap; línea 5, fracción 4 elución rAb ZH9F7-tCap; línea 6, western blot empleando anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) de cerdo conjugado con HRP. Imagen derecha SDS-PAGE seguido de tinción con azul de Coomassie (líneas 1-3): línea 1, marcador de peso molecular de 250 kDa; línea 2, fracción 4 elución rAb 7DEU-tCap; línea 3, fracción 5 elución rAb 7DEU-tCap; línea 4, western blot empleando anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) de cerdo conjugado con HRP.

6.3. Expresión de Antígeno Cap de PCV2 en Sistema *E. coli* BL21 Gold (DE3)

De manera paralela a la producción del anticuerpo rAb ZH9F7-Cap trabajamos con la expresión del antígeno Cap de PCV2a en el sistema de expresión Expi293F. Sin embargo, el sistema no permitió la producción eficiente del antígeno Cap y aunque posteriormente trabajamos con la versión truncada del mismo, no se logró la expresión en el sistema eucariota. Esto concuerda con lo reportado por otros autores quienes emplearon sistemas de expresión procariota obteniendo un rendimiento de hasta 1 mg por litro de cultivo de expresión, lo cual representa un alto costo en la expresión de proteína (Khayat *et al.*, 2019). La figura 10 muestra el resultado de la expresión y purificación de tCap en *E. coli* BL21 Gold (DE3) (líneas 2-8) y reconocimiento de la etiqueta de 6x histidina (línea 9) proporcionada por el vector pET28a(+). En todos los análisis, se observó la presencia de una banda de peso estimado de 26.8 kDa. Además, la concentración final de LPS en dichas fracciones (posterior a la remoción de endotoxina) fue <3 EU/mL considerado apropiado para el desarrollo de ensayos biológicos. Con el cambio de estrategia y bajo las condiciones experimentales ahora empleadas, logramos expresar el antígeno Cap de PCV2a en el sistema de expresión *E. coli* BL21 Gold (DE3), obteniendo un rendimiento final de 1 mg/g de peso seco. Lo anterior puede ser escalado a 4.4 mg por litro de expresión en el sistema, mostrando gran eficiencia y rentabilidad considerando los bajos costos de mantenimiento del sistema de expresión procariota. Una posible desventaja que presenta el sistema es que carece de mecanismos de modificaciones post-traduccionales, los cuales tienen un papel muy importante en la producción de diversas proteínas. La figura 10 (línea 10) muestra el reconocimiento de tCap por suero de cerdos sensibilizados a PCV2a, confirmando que conserva su capacidad inmunogénica para ensayos de reconocimiento. Al igual que para la expresión de la proteína Cap de PCV3 anteriormente reportado, el sistema *E. coli* BL21 Gold (DE3) demostró ser una alternativa eficiente en la expresión de proteínas Cap a un bajo costo (Liu *et al.*, 2020).

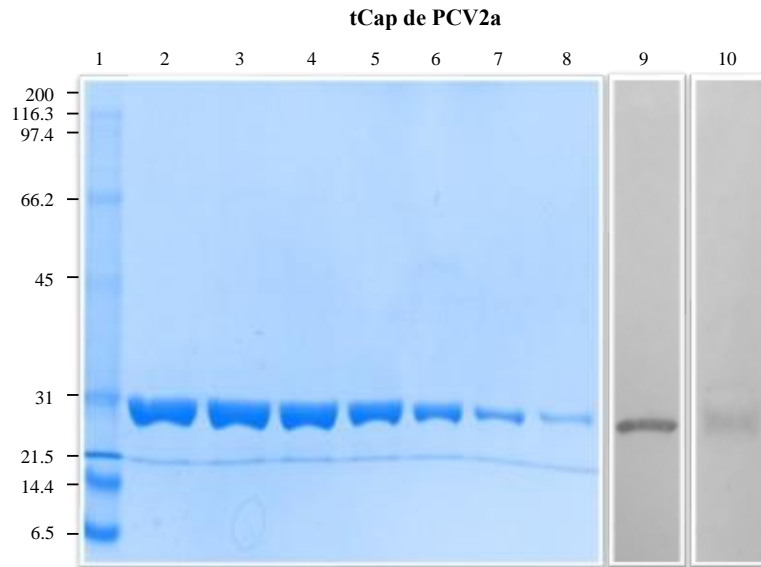


Figura 10. Proteína tCap de PCV2a expresada en *E. coli* BL21 Gold (DE3) purificada por IMAC. SDS PAGE seguido de tinción con azul de Coomassie (líneas 1-8): línea 1, marcador de peso molecular de 200 kDa; línea 2, fracción 24 elución tCap; línea 3, fracción 25 elución tCap; línea 4, fracción 26 elución tCap; línea 5, fracción 27 elución tCap; línea 6, fracción 28 elución tCap; línea 7, fracción 29 elución tCap; línea 8, fracción 30 elución tCap. Línea 9, Western blot utilizando anticuerpo anti-poli-Histidina conjugado con fosfatasa alcalina. Línea 10, Western blot utilizando suero policlonal de cerdo anti-PCV2a seguido de anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) de cerdo conjugado con HRP.

6.4. Evaluación del Tiempo de Vida Media del rAb ZH9F7 en Circulación Sanguínea

La figura 11 muestra la cinética de detección del rAb ZH9F7 en circulación sanguínea. Para los 4 animales que se evaluaron, se observó un comportamiento similar. A las 8 h posterior a la aplicación del rAb ZH9F7 se observa un declive en la absorbancia la cual continuó decayendo durante el resto de los tiempos que fueron evaluados. Encontramos que después de 8 h de la aplicación intradérmica, los niveles del anticuerpo rAb ZH9F7 en circulación fueron estadísticamente diferentes de los otros tiempos ($p > 0.05$), excepto 14 días post inyección.

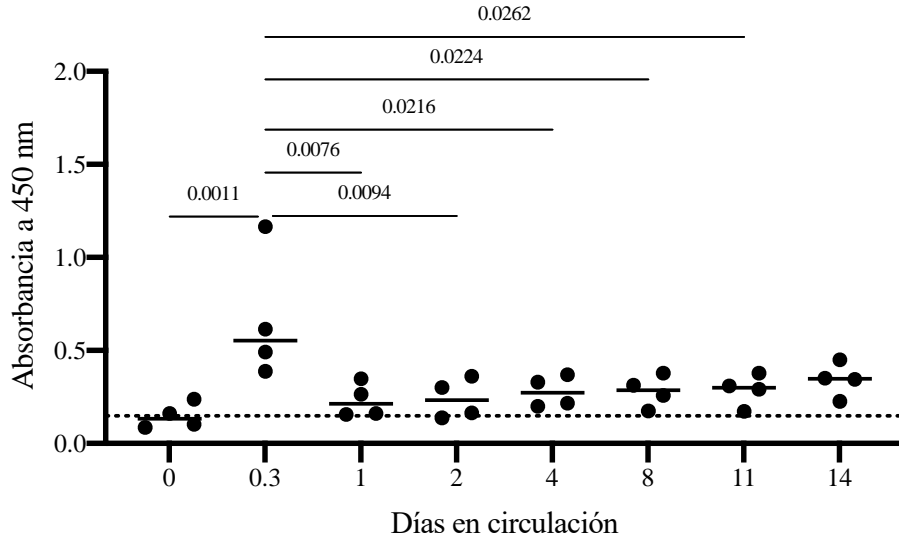


Figura 11. Tiempo de vida media del rAb ZH9F7 en la circulación sanguínea. Valores de absorbancia individuales en la determinación del rAb ZH9F7 en suero. Se realizó ANOVA de una vía seguido de comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer considerando un nivel de significancia $p < 0.05$. Valores de p indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias de absorbancias en los diferentes tiempos.

Cuando la vida media fue evaluada, encontramos que la detección del rAb ZH9F7 en sangre fue menor a 1 día. Es un poco contradictorio explicar estos resultados en términos de vida media de anticuerpos de tipo IgG. La causa del tan corto periodo de tiempo detectable en circulación podría estar relacionado a una rápida difusión en tejidos, rápida eliminación o la más favorable, la internalización del rAb ZH9F7 por células DEC205⁺ en sangre y tejidos. A pesar de que varios autores han evaluado y confirmado la extendida vida media de los anticuerpos recombinantes en circulación, la hipótesis generada es sustentada por los reportes que confirman que el acoplamiento a DEC205 induce el proceso de endocitosis (Saluja *et al.*, 2014; Tel *et al.*, 2011). De acuerdo con lo anterior, los resultados que obtuvimos podrían ser producto de que posterior al reconocimiento del receptor DEC205, el complejo rAb ZH9F7-DEC205 es internalizado. De esta forma, el rAb ZH9F7 aplicado por vía intravenosa no se encontraría libre en plasma para ser detectado por ELISA. Esto representa una ventaja para el sistema de direccionamiento rAb ZH9F7 en el contexto de direccionamiento de antígenos, dado que después del reconocimiento del receptor blanco, la célula debe internalizar el complejo anticuerpo-receptor.

6.5. Internalización de rAb ZH9F7 Mediada por Acoplamiento a Receptor DEC205

Para demostrar además que el rAb ZH9F7 promueve la internalización después de su acoplamiento a DEC205 en PBMCs porcinas, las células fueron teñidas con el rAb ZH9F7 biotinilado e incubadas a 37°C para permitir la endocitosis. La estrategia de marcaje e identificación de poblaciones se muestra en la figura 12a. Consistente con lo previamente reportado por Parra-Sánchez y colaboradores (2018), las poblaciones de cDC1 (CD14⁻CADM1⁺CD172a^{low}DEC205⁺), cDC2 (CD14⁻CADM1⁺CD172a^{high}DEC205⁺) y monocitos (CD14⁺DEC205⁺) en sangre periférica porcina fueron reconocidas por el rAb ZH9F7. Después de la incubación a 37°C durante diferentes tiempos se observa una reducción en la disponibilidad del receptor DEC205 en superficie. Lo anterior se vio reflejado por la reducción en la intensidad media de fluorescencia (IMF) en las diversas poblaciones de cDC1, cDC2 y monocitos, de manera tiempo-dependiente, comparado con el control a 4°C (figura 12b).

Después de graficar los porcentajes de reducción en la intensidad media de fluorescencia, se observa un decremento en la fluorescencia a valores de 36.7%, 46% y 31% para las cDC1, cDC2 y monocitos, respectivamente (figura 13). Esta tendencia la asociamos con la reducción en la disponibilidad de DEC205 en superficie, internalizado después del acoplamiento al rAb ZH9F7 biotinilado e incubado a 37°C. Hubo diferencias estadísticamente significativas en la reducción de la IMF para cada población de células DEC205⁺ después de 60 min bajo incubación a 37°C, comparado con las células incubadas a 4°C por 60 min. Sin embargo, no hubo diferencias entre los tipos celulares cDC1, cDC2 y monocitos, después de 60 min de incubación. Con estos ensayos demostramos que el tiempo de vida media reducido del rAb ZH9F7 en circulación se podría deber a que fue internalizado por células DEC205⁺ en sangre o en órganos linfoides.

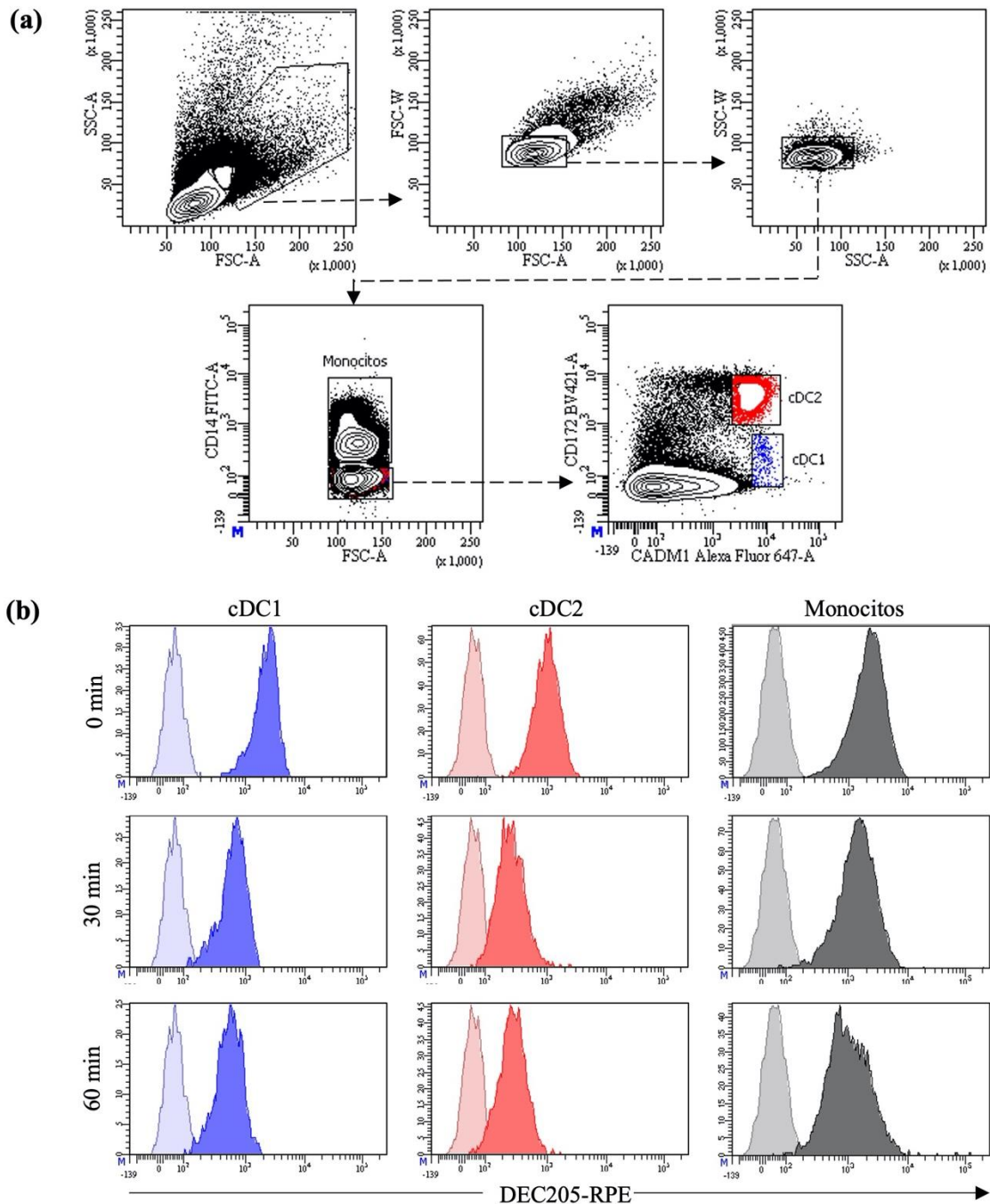


Figura 12. Internalización de receptor DEC205 después del acoplamiento del rAb ZH9F7 en cDC1, cDC2 y monocitos DEC205⁺. a) Estrategia de identificación de subpoblaciones cDC1, cDC2 y monocitos en sangre periférica. b) Disponibilidad de DEC205 en superficie de cDC1, cDC2 y monocitos después de 30 y 60 min de incubación con rAb ZH9F7 a 37°C. Los histogramas de color claro representan la fluorescencia menos uno (FMO), mientras que los histogramas de color intenso representan la disponibilidad de DEC205 en superficie de cDC1 (azul), cDC2 (rojo) y monocitos (gris).

Esta disminución en la intensidad media de fluorescencia pareciera concordar con lo que se observa en otros receptores como Siglec-1, CLEC-12A y CLEC1A en macrófagos, cDC1 y cDC2 porcinos, respectivamente (Delputte *et al.*, 2011; Álvarez *et al.*, 2020). Auray *et al.* (2016) reportaron que todas las DCs en sangre periférica porcina expresan DEC205, aunque la población de cDC1 muestra una mayor expresión del receptor, seguido de monocitos, cDC2 y pDCs (Auray *et al.*, 2016). Nuestros resultados concuerdan con dichos reportes, donde cDC1 y monocitos mostraron mayor expresión de DEC205 comparado con la población de cDC2 en sangre periférica porcina. Por primera vez, demostramos en el modelo porcino que el rAb ZH9F7 no solo reconoce diferentes poblaciones de células DEC205, sino que también el acoplamiento hacia el receptor blanco desencadena un proceso de internalización mediado por receptor.

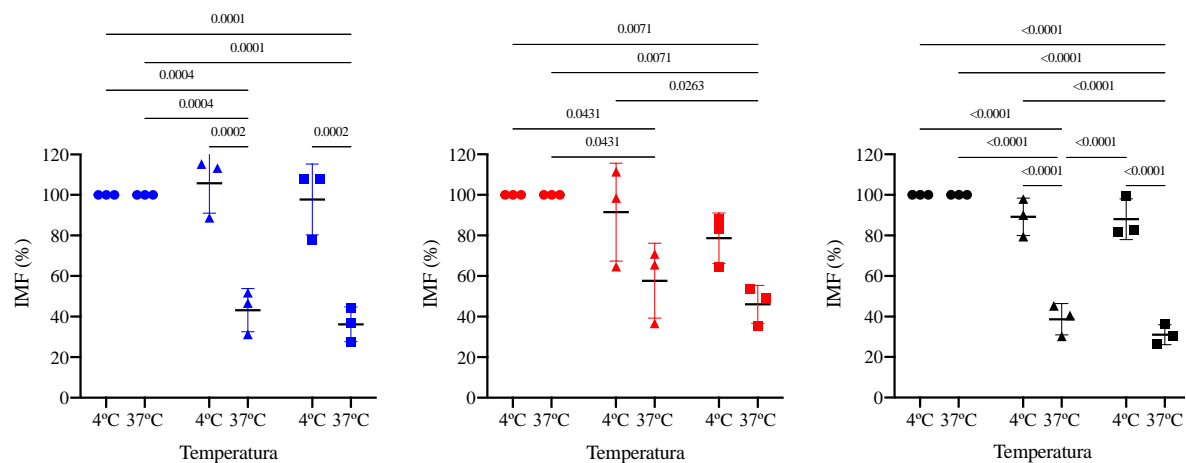


Figura 13. Porcentaje de intensidad media de fluorescencia (IMF) después de la incubación a 37°C y 4°C. Poblaciones cDC1 (azul), cDC2 (rojo) y monocitos (negro) durante 0 min (círculos), 30 min (triángulos) y 60 min (cuadrados). Se presentan los valores de la IMF obtenidos de 3 cerdos \pm SD. Se realizó ANOVA de dos vías seguido de comparación de medias por prueba de Tukey-Kramer considerando una significancia $p < 0.05$. Los valores de p indican diferencias estadísticamente significativas entre IMF después de la incubación a 37 °C y 4 °C durante 0 min (círculos), 30 min (triángulos) y 60 min (cuadrados).

A pesar de que el mecanismo exacto por el cual las DCs pueden llevar a cabo presentación cruzada, un paso importante en dicho proceso es que los antígenos extracelulares cargados en la vesículas endocíticas puedan escapar hacia el compartimiento citoplasmático (Embgenbroich & Burgdorf, 2018). En humanos, el direccionamiento de antígenos a DEC205 conduce un proceso en el cual,

los antígenos puedan seguir el procesamiento por la vía de MHC-II y escapar de los endosomas tempranos, permitiendo su localización intracitoplasmática con acceso a la maquinaria de procesamiento de MHC-I por la ruta endosoma-citosol (Saluja *et al.*, 2014). En el modelo porcino, es necesario confirmar si el sistema de direccionamiento permite el escape de antígenos desde endosomas tempranos hacia el citoplasma, con la posibilidad de presentación no solo por MHC-II sino también por MHC-I activando linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. La siguiente etapa tuvo como objetivo explorar la funcionalidad del rAb ZH9F7 para reconocer diferentes poblaciones de células DEC205⁺ *in vivo*.

6.6. Evaluación de la Funcionalidad de rAb ZH9F7 Reconociendo Células DEC205⁺ *In Vivo*

La piel de cerdo es un órgano rico en DCs con capacidades migratorias (Marquet *et al.*, 2011b; Marquet *et al.*, 2014). Por lo tanto, nuestro objetivo fue el explorar las capacidades del rAb ZH9F7 para reconocer y teñir diferentes tipos de DCs *in vivo*. Después de aplicar rAb ZH9F7, se tomaron biopsias de piel, se recolectaron las células migratorias y la población de interés se seleccionó por citometría de flujo de acuerdo con la figura 14a. Se seleccionó la población de células de mayor tamaño y complejidad seguido de eliminación de dobletes. Posteriormente, esa población fue analizada para la expresión de CD163 y CD172a, identificando posibles moDC y macrófagos CD163⁺CD172a⁺ (posteriormente referidos como moDC/Macro). Luego, la población CD163⁻CD172a^{+/-} se analizó para la expresión de CADM1 y CD172a identificando tanto cDC1 CD163⁻CD172a^{-/low}CADM1⁺ como posibles cDC2 y LC (de ahora en adelante referidas como cDC2/LC) por su expresión de CD163⁻CD172a^{high} CADM1⁺. El análisis de DCs migratorias de la piel demostró una proporción más alta de células cDC2/LC migratorias de la piel en comparación con las cDC1, lo cual corresponde a lo reportado por Marquet y col., en la evaluación de poblaciones de DCs migratorias de explantes de piel (Marquet *et al.*, 2011b).

En la figura 14b, los histogramas representan los resultados de 1 de 3 experimentos independientes. Las células migratorias del sitio de inyección de rAb ZH9F7 mostraron fenotipos cDC1, cDC2/LC y moDC/Macro positivos para la tinción *in vivo* con el rAb ZH9F7. Para establecer las regiones para una población positiva, se analizaron las cDC1, cDC2/LC y moDC/Macro migratorios de las

biopsias de piel del grupo control PBS. De manera complementaria, las células migratorias de los explantes de piel fueron teñidas *in vitro* para evaluar la expresión de DEC205 en las diferentes poblaciones cDC1, cDC2/LC y moDC/Macro.

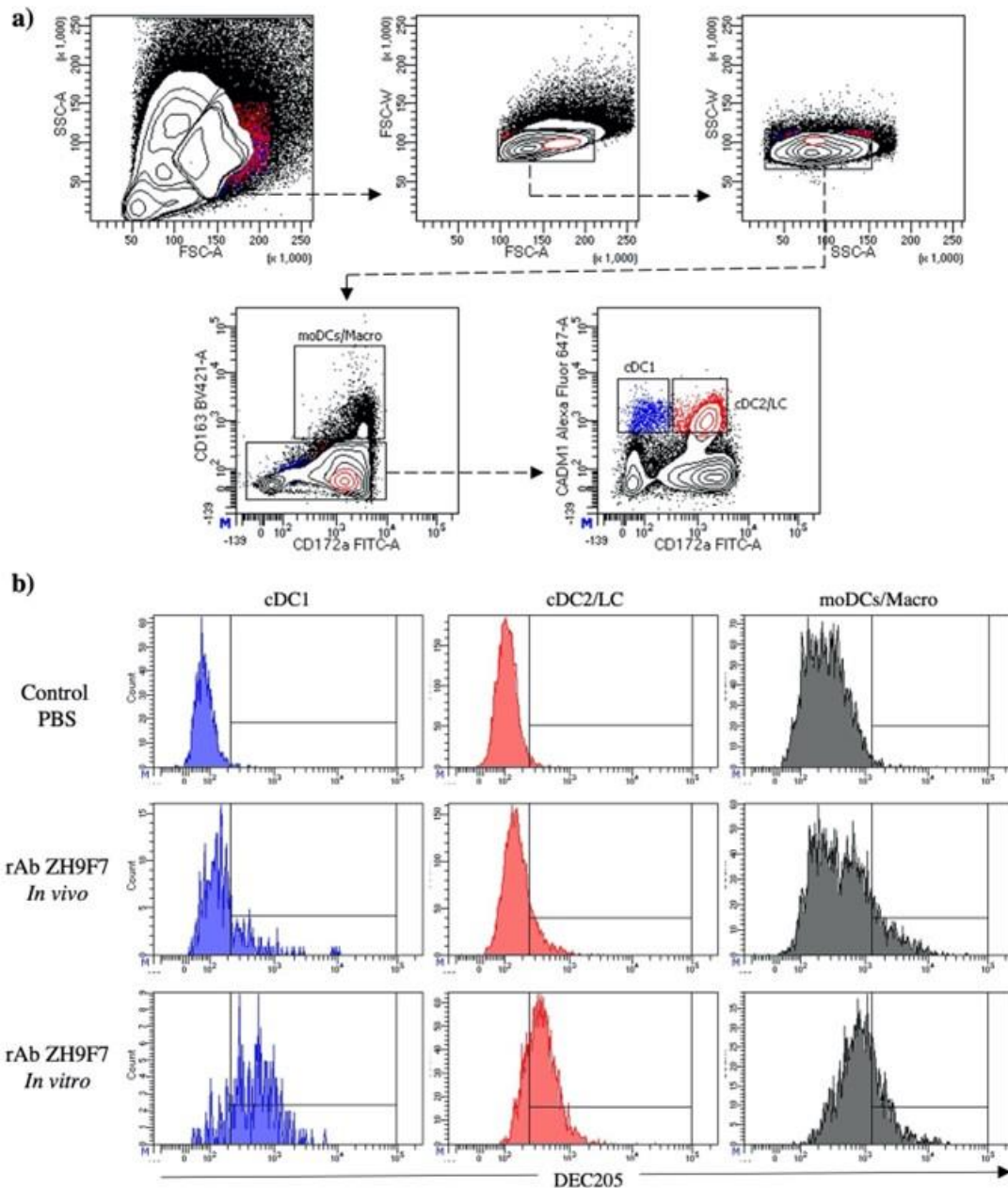


Figura 14. Identificación de células migratorias de explantes de piel positivas a la tinción con rAb ZH9F7 *in vivo* e *in vitro*. a) Estrategia de identificación de potenciales moDC/Macro, cDC1 y cDC2/LC en células migratorias de explantes de piel. b) Determinación de células DEC205⁺ positivas a la tinción con el anticuerpo rAb ZH9F7 *in vivo* e *in vitro* (resultado representativo de al menos 3 experimentos independientes).

La figura 15 muestra el porcentaje de células migratorias teñidas *in vivo* con rAb ZH9F7, donde el 23.4% de cDC1, el 14.8 % de cDC2/LC y el 11.6 % de moDC/Macro fueron positivos. Las poblaciones de cDC1 y cDC2/LC de los cerdos del grupo rAb ZH9F7 fueron estadísticamente diferentes de sus contrapartes en los cerdos de control PBS ($p < 0.05$). Por otra parte, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las moDC/Macro positivas a la tinción *in vivo* con el rAb ZH9F7 y el grupo control PBS ($p > 0.05$).

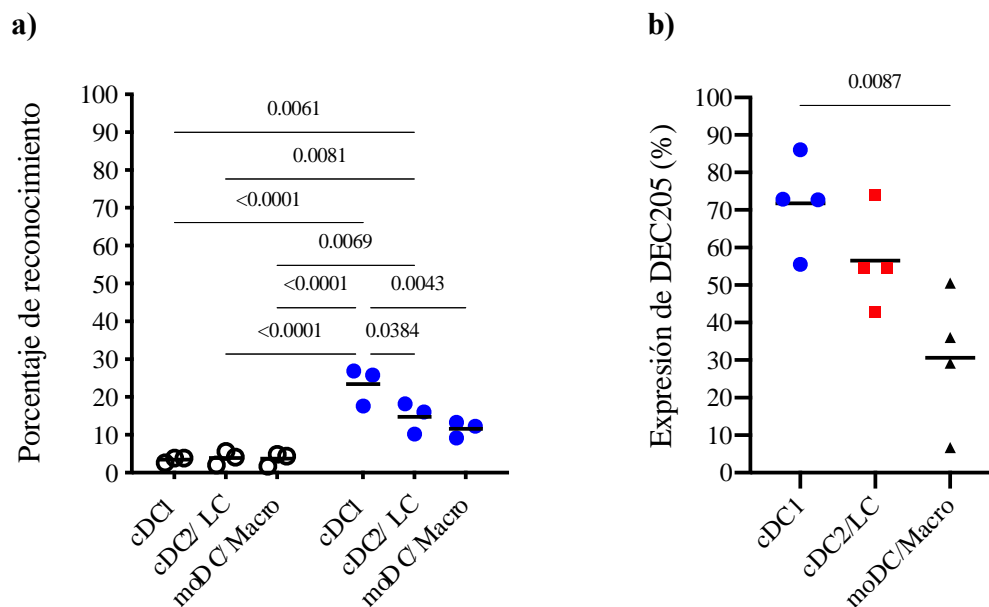


Figura 15. Porcentajes de reconocimiento de cDC1, cDC2/LC y moDCs/Macro por la tinción con el rAb ZH9F7. a) Representación del porcentaje de las células DEC205⁺ migratorias de piel teñidas *in vivo* con el rAb ZH9F7 (puntos azules) y cerdos control sin teñir (puntos negros). b) Porcentajes de expresión de DEC205 en las diferentes poblaciones migratorias de los explantes de piel, teñidas *in vitro*. Se realizó ANOVA de dos (a) y una vía (b) seguido de comparación de medias por prueba de Tukey-Kramer ($p < 0.05$). Los valores de p denotan diferencias estadísticamente significativas en las medias de los diferentes grupos.

Aunque las poblaciones cDC2/LC presentaron la mayor proporción comparado con las cDC1 en células migratorias (figura 14a), las cDC1 presentaron un mayor porcentaje de positividad a la tinción *in vivo* con rAb ZH9F7, seguidos por cDC2/LC y moDC/Macro ($p < 0.05$). Esto puede ser justificado dado que los niveles de expresión de DEC205 en cDCs parece variar de manera tejido-dependiente. En amígdalas de cerdo, hay una mayor expresión de DEC205 en la población cDC1 en comparación de las cDC2. En contraste, en el bazo, ganglios linfáticos submaxilar,

mesentéricos, la población cDC2 fue la que presenta un mayor nivel de expresión de DEC205 aunque no fue estadísticamente diferente (Parra-Sánchez *et al.*, 2018).

De esta manera, las diferencias en la expresión de DEC205 entre las poblaciones de cDC1 y cDC2 en la piel podría estar relacionada con una mayor probabilidad de ser teñidas *in situ*. Al analizar la expresión de DEC205 en las células migratorias, teñidas con el rAb ZH9F7 *in vitro*, encontramos que las presuntas poblaciones de cDC1, cDC2/LC y moDC/Macro presentaron una expresión de DEC205 promedio de 71.7%, 56.5% y 30.6%, respectivamente. Es razonable que la tinción *in vivo* sea preferentemente a cDC1 sobre el resto de las poblaciones puesto que esta población presenta aparentemente una mayor expresión de DEC205 respecto a las cDC2/LC y moDC/Macro, aunque sólo en estas últimas hubo diferencias estadísticamente significativas (figura 15b).

En otro estudio que evaluó el direccionamiento de antígenos hacia cDC1 poXCR1⁺ porcinas, se encontró que, al ser aplicado vía intradérmica, el sistema de direccionamiento fue capaz de reconocer 35% de las cDC1 en piel, siendo eficiente en la inducción de la producción de anticuerpos contra el antígeno direccionado M2e de influenza porcina (Deloizy *et al.*, 2017). En el caso de nuestro estudio, es posible que el porcentaje real de células que fueron teñidas *in vivo* con el rAb ZH9F7 podría estar siendo subestimado, ya que de acuerdo con Deloizy y colaboradores (2017), es posible que después de que se dio la internalización, la señal fluorescente esté siendo degradada o secuestrada por los procesos de degradación intracelular posterior a su internalización. Una vez confirmado que rAb ZH9F7 reconoce poblaciones de cDC1, cDC2/LC y moDC/Macro de la piel, evaluamos la capacidad de estas células para llegar a los ganglios linfáticos inguinales superficiales, un sitio donde se lleva a cabo la presentación de antígenos a los linfocitos T vírgenes. La figura 16a presenta la estrategia para seleccionar la población de interés en ganglios linfáticos. Esta población tiene un elevado número de linfocitos que expresan el receptor DEC205. Se marcaron los receptores CD3 y CD21 para descartar el grupo de linfocitos T y B, respectivamente. Posteriormente, se analizó la población de CD3⁻CD21⁻ para determinar la expresión de CADM1 y CD163 (figura 16a). Luego, los CD3⁻CD21⁻CADM1⁺CD163⁻ fueron clasificados como DC potenciales mientras que la población CD3⁻CD21⁻CADM1^{+/low}CD163⁺ fueron clasificados como macrófagos, en acuerdo con lo anteriormente reportado (Maisonasse *et al.*, 2016; Soldevila *et al.*, 2018). La figura 16b muestra histogramas representativos de 3 experimentos independientes. Tanto los linfocitos (histogramas verdes) como macrófagos (histogramas negros) y las DCs (histogramas azules) fueron positivas a la tinción *in vivo* con rAb ZH9F7 después de la aplicación

intradérmica.

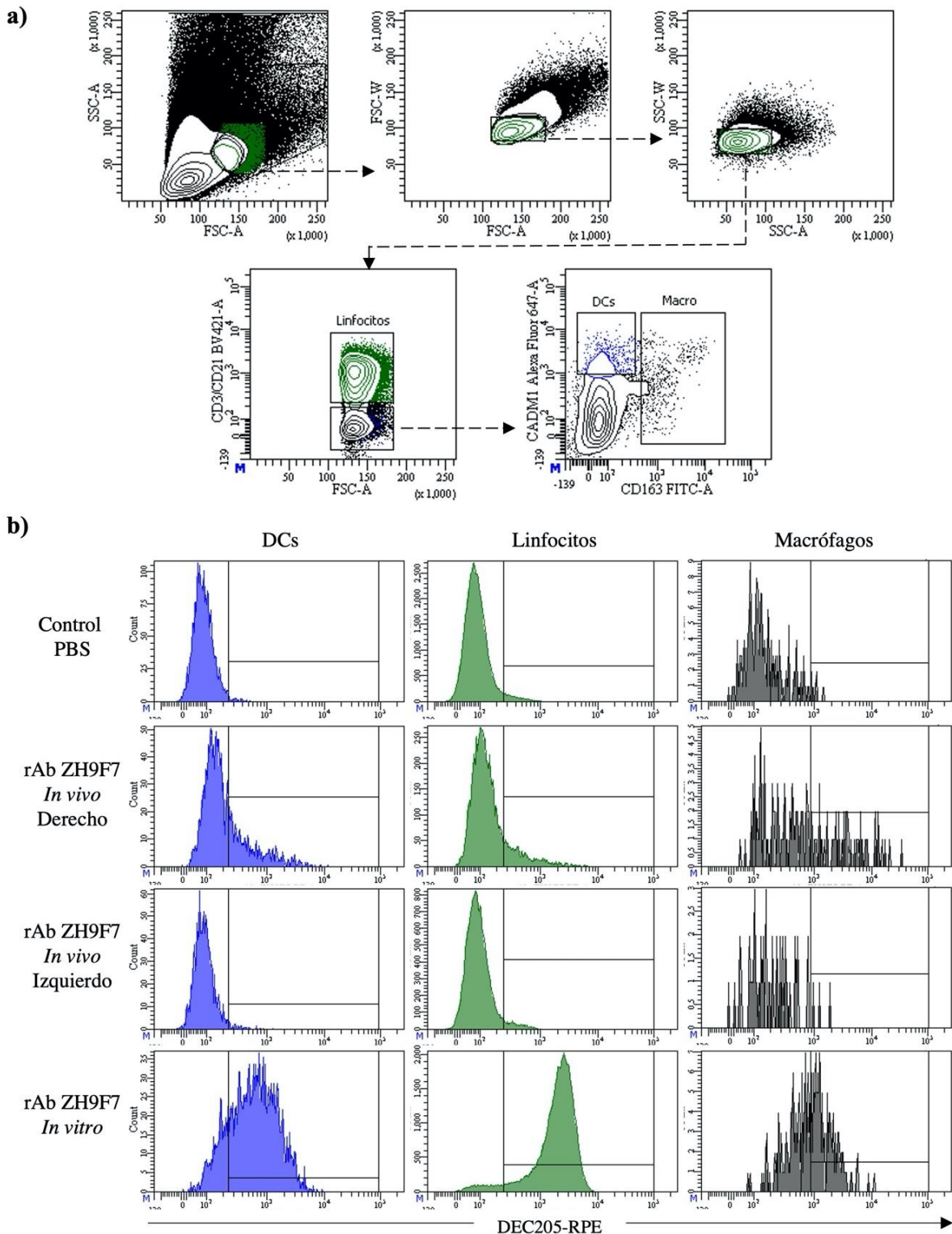


Figura 16. Identificación de DCs, macrófagos y linfocitos de ganglios linfáticos inguinales teñidos con el rAb ZH9F7. a) Estrategia para identificar linfocitos, DCs y macrófagos en ganglio linfático inguinal. b) Determinación de células DEC205⁺ positivas a la tinción con el rAb ZH9F7 *in vivo* e *in vitro* (resultados representativos de al menos 3 experimentos independientes).

Las poblaciones identificadas en el grupo control PBS fueron analizadas para delimitar los intervalos de positividad a la tinción con rAb ZH9F7. La presencia de DC, macrófagos y linfocitos positivos a la tinción con rAb ZH9F7 fue predominantemente en el ganglio linfático inguinal superficial derecho en comparación con los presentes en el ganglio linfático inguinal superficial izquierdo. De forma adicional se muestra el porcentaje de expresión de DEC205 tras la tinción *in vitro* con el rAb ZH9F7. La figura 17a muestra los porcentajes promedio de DCs, linfocitos y macrófagos teñidos con el rAb ZH9F7 *in vivo*, los controles grupo PBS (puntos negros), así como los ganglios linfáticos inguinales derecho (puntos azul marino) e izquierdo (puntos azul claro) del grupo teñido con rAb ZH9F7. Los porcentajes promedio de positividad a la tinción *in vivo* con el rAb ZH9F7 del lado derecho (mismo lado de la aplicación intradérmica de rAb ZH9F7) fueron de 27.4% de DC, 12.9% de linfocitos y 16.3% de macrófagos. Por el contrario, las células teñidas con el rAb ZH9F7 en ganglio izquierdo, sitio opuesto a la aplicación de rAb ZH9F7, representaron el 4.9% de DCs, el 1.9% de linfocitos y 5.2% de macrófagos.

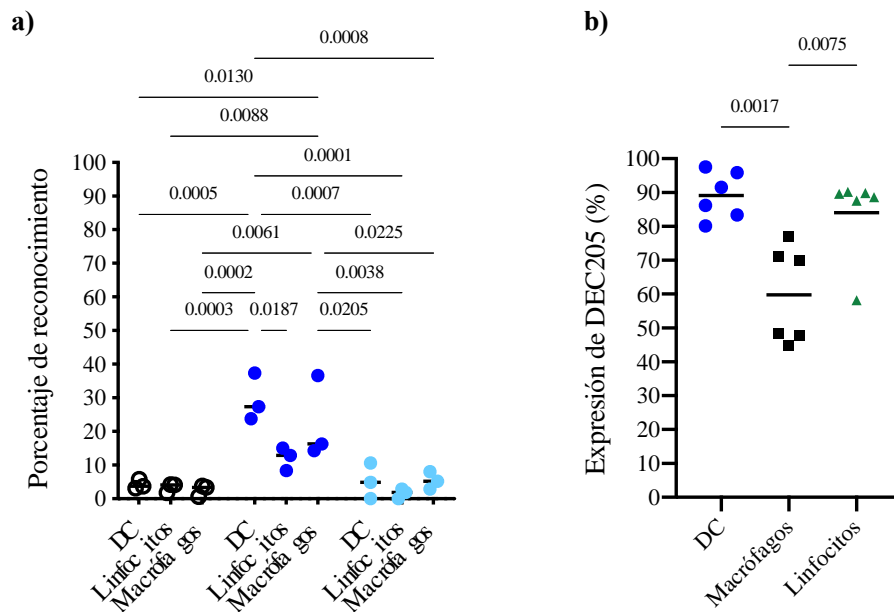


Figura 17. Porcentaje de DCs, linfocitos y macrófagos de ganglio linfático inguinal teñidos con el rAb ZH9F7. a) Representación del porcentaje de DCs, linfocitos y macrófagos en ganglio linfático positivos a la tinción con rAb ZH9F7 *in vivo* de cerdos de control (negro), ganglios inguinales derechos de grupo rAb ZH9F7 (azul marino) y ganglios inguinales izquierdos rAb ZH9F7 (azul cielo). b) Porcentajes de expresión de DEC205 en las diferentes poblaciones en ganglio linfático teñidas *in vitro*. Se realizó ANOVA de dos (a) y una vía (b) seguido de comparación de medias por prueba de Tukey-Kramer ($p < 0.05$). Los valores de p denotan diferencias estadísticamente significativas en las medias de los diferentes grupos.

La determinación de linfocitos y DCs teñidas con el rAb ZH9F7 en el ganglio derecho fue estadísticamente mayor a lo encontrado en el grupo control PBS ($p < 0.05$). En el análisis de porcentajes de células positivas a la tinción con rAb ZH9F7 en ganglio derecho (figura 17 b), las DCs fueron estadísticamente mayores en comparación con los linfocitos. La presencia de las células teñidas *in vivo* fue predominantemente en el ganglio linfático local derecho, siendo estadísticamente mayores que su contraparte en el ganglio izquierdo, anatómicamente más lejano a la aplicación del rAb ZH9F7. Por lo tanto, la aplicación intradérmica de rAb ZH9F7 permitió la tinción de células DEC205⁺ *in situ* las cuales posiblemente migraron a tejido linfoide regional, evidenciado por la presencia de DC teñidas con rAb ZH9F7 en el ganglio linfático regional. Posterior al análisis de la expresión de DEC205 teñido *in vitro*, encontramos que las DCs y linfocitos fueron las que poseen una mayor expresión de DEC205 en el ganglio inguinal superficial, del 89.9% y 84%, seguido del 59.8% en macrófagos, lo que concuerda con lo reportado por Parra-Sánchez y colaboradores (2018). En cerdo, las cDCs presentaron una expresión de DEC205 que varía del 60% al 70% en tejidos linfoides periféricos (Parra-Sánchez *et al.*, 2018). Sin embargo, nuestra estrategia de marcaje no permitió la diferenciación entre diversas subpoblaciones de DCs teñidas con rAb ZH9F7 en ganglios linfáticos.

Lo que si confirmamos es que el rAb ZH9F7 reconoce diferentes poblaciones de DCs DEC205⁺ alcanzando ganglios linfáticos regionales. Estos resultados podrían ser una combinación de la presencia de DCs teñidas que migraron desde la piel y el alcance del rAb ZH9F7 a diferentes poblaciones del ganglio linfático inguinal. En el modelo murino, una estrategia para evitar la migración celular hacia ganglios linfáticos es el bloqueo de la actividad de las quimiocinas CCL19 y CCL21 utilizando anticuerpos dirigidos a dichas citocinas o ratones carentes de la expresión del receptor CCR7 (Kobayashi *et al.*, 2017). Sin embargo, no contamos con las suficientes herramientas para bloquear la migración celular en el modelo porcino y demostrar entonces, que la presencia de células positivas en el ganglio es debido solamente a la migración.

Las DCs se encuentran distribuidas en órganos periféricos, capturando y procesando antígenos para después migrar a ganglios linfáticos regionales donde llevan a cabo la presentación de antígenos a los linfocitos T vírgenes, activando la respuesta celular y humoral (Banchereau *et al.*, 2000; Fadilah & Cheong, 2007). Después de la tinción *in situ* con el rAb ZH9F7 y estimulación con poly (I:C), las DCs teñidas fueron detectadas en los ganglios linfáticos inguinales, cercanos al sitio de la aplicación. Esto debido a que el anticuerpo siguió la circulación linfática, alcanzando los

ganglios más cercanos al sitio de aplicación. Esto nos indica que, bajo las condiciones evaluadas, nuestro sistema no fue capaz de generar un direccionamiento sistémico y alcanzar más tejidos linfáticos distales, limitándose a una migración regional. Bonifaz y colaboradores (2004) comprobaron que, en el modelo murino, la aplicación de un mAb anti-DEC205 fue altamente eficiente promoviendo un direccionamiento sistémico, alcanzando órganos linfáticos distales como el bazo, de una manera tiempo dependiente. Sus resultados mostraron la gran capacidad del anti-DEC205 para teñir DCs DEC205 en varios órganos linfoides secundarios, siendo detectable hasta 3 días de la inyección subcutánea. Considerando las diferencias entra ambas estrategias, puntualizamos que la cantidad de anticuerpo que aplicamos no fue suficiente para alcanzar un direccionamiento sistémico y la vía de aplicación intradérmica probablemente no favorece este efecto. Quizá este sea alcanzado realizando un escalamiento en dosis de anticuerpo aplicado o probando una ruta diferente de inyección del direccionamiento, por ejemplo, intradérmico-subcutáneo, intradérmico-intravenoso.

6.7. Reconocimiento de DCs DEC205⁺ de Piel Porcina por Microscopía Confocal

Para demostrar de manera complementaria que el anticuerpo rAb ZH9F7 reconoce DCs DEC205⁺ en piel, el anticuerpo rAb ZH9F7-eGFP fue aplicado vía intradérmica y 6 h después se tomó una biopsia de piel del sitio de aplicación. Las micrografías mostradas en la figura 18a fueron tomadas y analizadas encontrando una gran cantidad de infiltrado celular lo cual se explica debido a la aplicación del estímulo inflamatorio poly (I:C) y células positivas para el marcaje del rAb ZH9F7-eGFP (células verdes, flechas verdes). Complementando el panel de tinción con otros marcadores para identificar DCs como CADM1 y CD172a, fue posible encontrar la presencia de la población cDC1 (flechas rojas) y cDC2 (flechas verdes), las cuales fueron teñidas *in situ* con el anticuerpo rAb ZH9F7-eGFP (genéticamente conjugado). La figura 18b muestra dos campos diferentes en los que se confirma que el rAb ZH9F7 permitió la tinción *in vivo* de las poblaciones cDC1 y cDC2 DEC205⁺ en piel de cerdo. Complementariamente a los análisis de citometría de flujo, los experimentos de microscopía confocal corroboran que el anticuerpo rAb ZH9F7-eGFP reconoció las poblaciones de células cDC1 y cDC2 DEC205⁺ *in situ*. Lo anterior debido a la localización con otros marcadores tales como CADM1 y CD172a, lo cual nos permitió diferenciar entre potenciales

cDC1 y cDC2 en piel porcina.

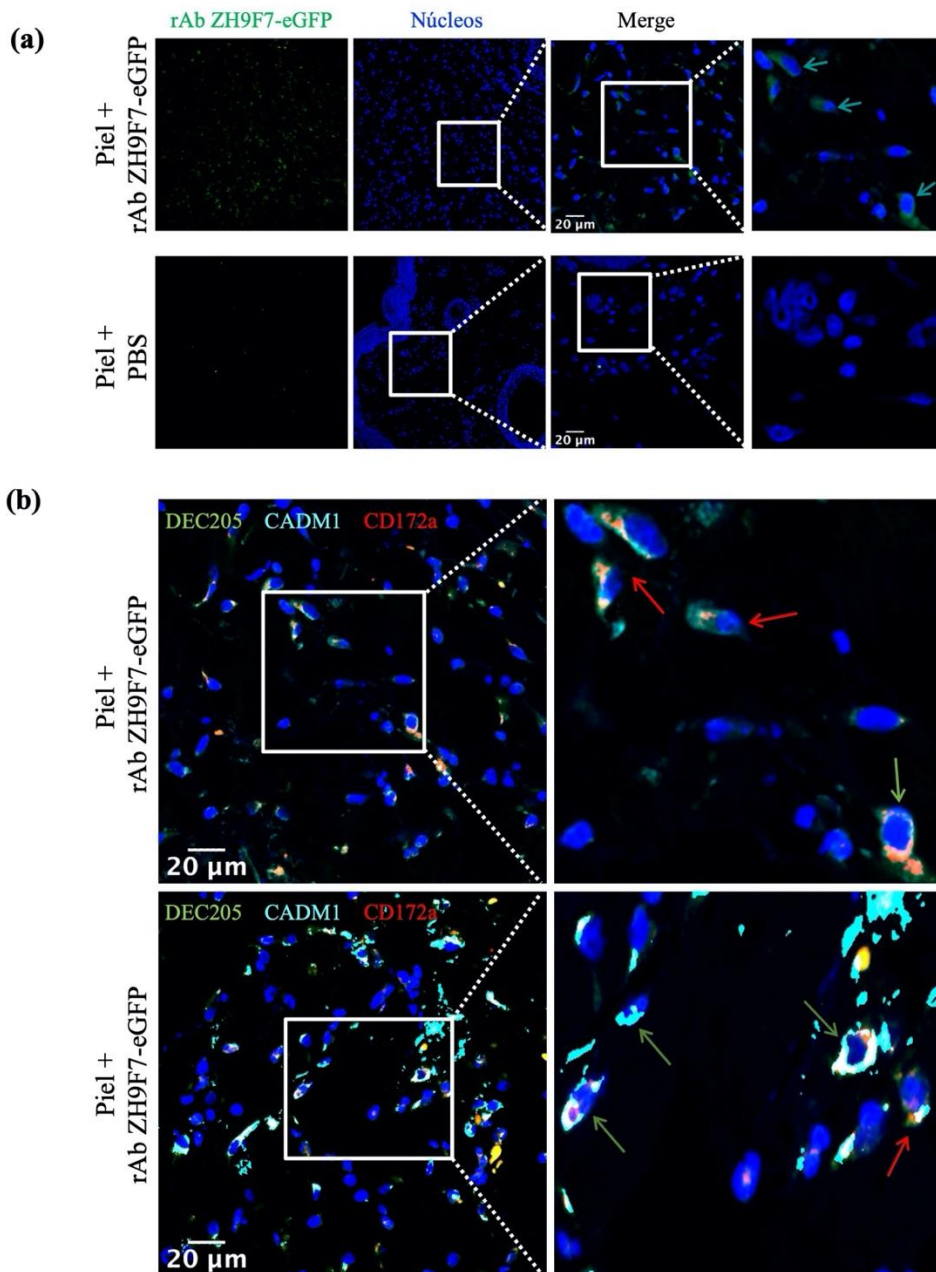


Figura 18. Identificación de cDCs DEC205⁺ teñidas *in situ* con rAb ZH9F7-eGFP. a) En los paneles superior e inferior se muestran células teñidas con el rAb ZH9F7-eGFP (flechas verdes) y sin teñir (PBS), respectivamente. b) Identificación de células potenciales cDC1 DEC205⁺CADM1⁺ (flechas rojas) y cDC2 DEC205⁺CADM1⁺CD172a⁺ (flechas verdes) teñidas *in situ* con el rAb ZH9F7-eGFP. Micrografías de inmunofluorescencia representativas de un área ampliada (barra de escala= 20μm). Datos de diferentes regiones de biopsias.

6.8. Evaluación de la Funcionalidad del rAb ZH9F7-tCap Tiñendo Células DEC205⁺

Una vez que confirmamos que el rAb ZH9F7 desencadenó la internalización mediada por receptor tanto en cDC1, cDC2 y monocitos de sangre porcina y reconoció diversas poblaciones de DCs *in vivo*, nos propusimos evaluar la capacidad del rAb ZH9F7-tCap para reconocer diferentes poblaciones de DCs en sangre, piel y ganglios linfáticos porcinos, así como evaluar la especificidad del sistema, incluyendo el control de isotipo ratón x cerdo rAb 7DEU-tCap. Después de la expresión de ambas variantes, evaluamos la capacidad de reconocimiento hacia células DEC205⁺ en sangre periférica. La población de interés fue determinada como se mencionó previamente en la identificación de monocitos, cDC1 y cDC2 DEC205⁺ en sangre periférica. La figura 19a muestra la expresión del receptor DEC205 en diferentes poblaciones de cDC1, cDC2 y monocitos detectada a través de la tinción con los diferentes rAb ZH9F7, rAb ZH9F7-Cap, y control de isotipo rAb 7DEU-Cap.

En la figura 19b, ambos anticuerpos anti-DEC205 rAb ZH9F7 y rAb ZH9F7-tCap mostraron un alto porcentaje de reconocimiento a células cDC1, cDC2 y monocitos DEC205⁺ (superior al 84%, 66% y 59%, respectivamente) comparadas con el control de isotipo rAb 7DEU-tCap ($p < 0.05$). Estos resultados confirman que la presencia del antígeno tCap en el rAb ZH9F7 no afectó su capacidad de reconocimiento *in vitro* hacia células DEC205⁺, similar a su contraparte sin antígeno Cap. Adicionalmente, estos resultados nos indican que a pesar de que el control de isotipo ratón x cerdo rAb 7DEU-tCap presenta una especificidad irrelevante, hay un porcentaje de reconocimiento promedio de 31% en cDC1, 25% cDC2 y 9.8% en monocitos en circulación. Una posibilidad de este fondo en el reconocimiento de un control de isotipo puede ser debido a la fracción Fc del IgG1 porcina del anticuerpo quimérico ratón x cerdo. En humano y ratón, se han caracterizado los sitios puntuales en la región Fc para suprimir la capacidad de reconocimiento por receptores Fc γ R y C1q, siendo la sustitución LALA-PG la que suprimió en este reconocimiento (Lo *et al.*, 2017; Schlothauer *et al.*, 2016). Sin embargo, en el modelo porcino esto no ha sido caracterizado y las regiones correspondientes a la mutación LALA-PG no se encontraron en el dominio Fc del IgG porcino. De esta forma este fondo en el control isotipo rAb 7DEU-tCap podría ser debido a un reconocimiento por la fracción Fc y no propiamente por la región de especificidad del sitio de unión

a antígeno del anticuerpo. Una alternativa para reducir este fondo podría ser la aplicación de un formato de anticuerpo carente de Fc, como un anticuerpo de cadena sencilla scFv anti-DEC205.

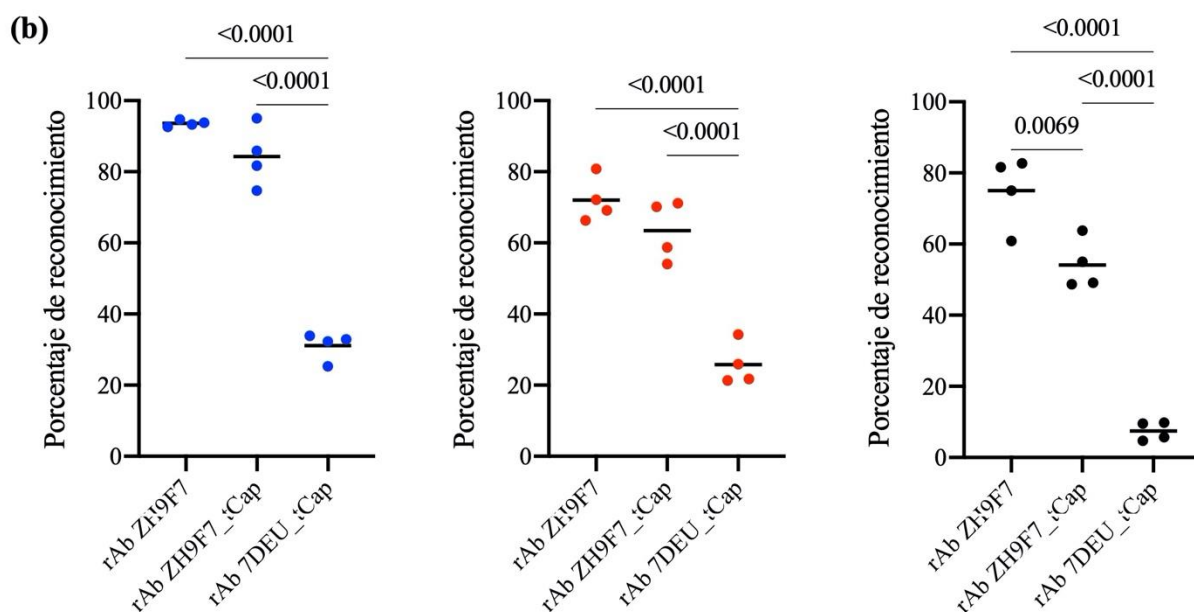
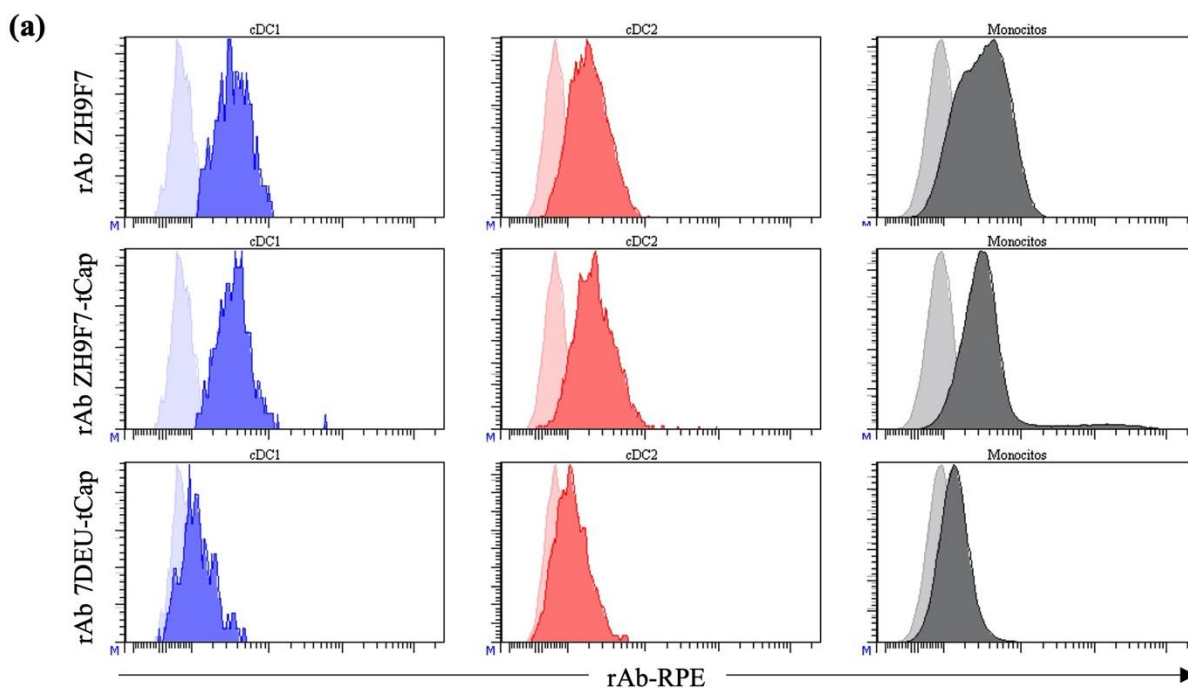


Figura 19. Evaluación de la funcionalidad de rAb ZH9F7-tCap y rAb 7DEU-tCap para reconocer células mononucleares DEC205⁺ de cerdo. a) Identificación de cDC1, cDC2 y monocitos DEC205⁺ después de la tinción con rAb ZH9F7-tCap y rAb 7DEU-tCap *in vitro*. Los histogramas de intensidad más ligero ilustran el FMO y los histogramas de colores intensos muestran el reconocimiento de cDC1 (azul), cDC2 (rojo) y monocitos (gris) DEC205⁺. Los histogramas representan el resultado de uno de cuatro animales. b) Análisis gráfico de los porcentajes de cDC1 (azul), cDC2 (rojo) y monocitos (negro) positivas al marcaje con los rAb ZH9F7, rAb ZH9F7-tCap

y control de isotipo rAb 7DEU-tCap. Se realizó ANOVA de una vía seguido de comparación de medias por prueba de Tukey-Kramer ($p < 0.05$). Los valores de p denotan diferencias estadísticamente significativas en las medias de los diferentes grupos.

Al continuar con la evaluación de como se ve afectado el direccionamiento hacia células DEC205 ante el uso del anticuerpo rAb ZH9F7-tCap, 24 h después de que el rAb ZH9F7-tCap o rAb 7DEU-tCap control de isotipo fueron aplicados vía intradérmica, se tomaron biopsias de piel y se retiraron los ganglios linfáticos inguinales derechos. En la figura 20a se muestra la misma estrategia de identificación de DCs migratorias de piel. En la figura 20b, los gráficos de puntos representan resultados de 1 de 3 experimentos independientes. Las células migratorias de los explantes de piel, tomados del sitio de inyección de los rAbs muestran fenotipos cDC1, cDC2/LC y potenciales moDC/Macro positivos (figura 21) a la tinción con el rAb ZH9F7-tCap (en promedio 12.87%, 9.1%, y 5.56%, respectivamente). Las células cDC1, cDC2/LC y moDC/Macro migratorias de las biopsias de piel del grupo control PBS presentaron valores de fluorescencia de fondo del 4.53%, 4.66%, y 4.03%, respectivamente. De manera similar, los valores de fluorescencia encontrados en las células obtenidas del grupo control isotipo rAb 7DEU-tCap fueron 3.26%, 8.03%, y 6.66%, respectivamente. Diferencias estadísticamente significativas entre las células cDC1 teñidas fueron encontradas entre el grupo rAb ZH9F7-tCap y ambos grupos controles isotipo rAb 7DEU-tCap y PBS ($p < 0.05$). Encontramos mayor porcentaje de células cDC2/LC DEC205⁺ teñidas con el rAb ZH9F7-tCap en comparación con el grupo control PBS. No hubo diferencias entre los porcentajes de células cDC2/LC positivas al marcaje entre el grupo rAb ZH9F7-tCap y el grupo control de isotipo. La hipótesis es que esto podría estar relacionado a que las cDC2 tienen una alta capacidad de capturar antígenos solubles, como previamente ha sido reportado para las cDC2 porcinas de sangre y piel (Edwards *et al.*, 2017; Marquet *et al.*, 2011b). Finalmente, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en el grupo de moDCs/Macro positivos al direccionamiento en ninguno de los 3 grupos de tratamiento.

Una vez confirmado que el rAb ZH9F7-tCap reconoció las poblaciones cDC1 y cDC2 en piel, se evaluó la capacidad de estas células para alcanzar ganglios linfáticos inguinales y potencialmente dar lugar a la presentación de antígenos a linfocitos T vírgenes. La figura 22a muestra la estrategia por la cual las poblaciones celulares de interés fueron seleccionadas. Las suspensiones de células del ganglio linfático obtenidas fueron analizadas siguiendo la estrategia previamente mencionada para células obtenida de ganglio linfático inguinal.

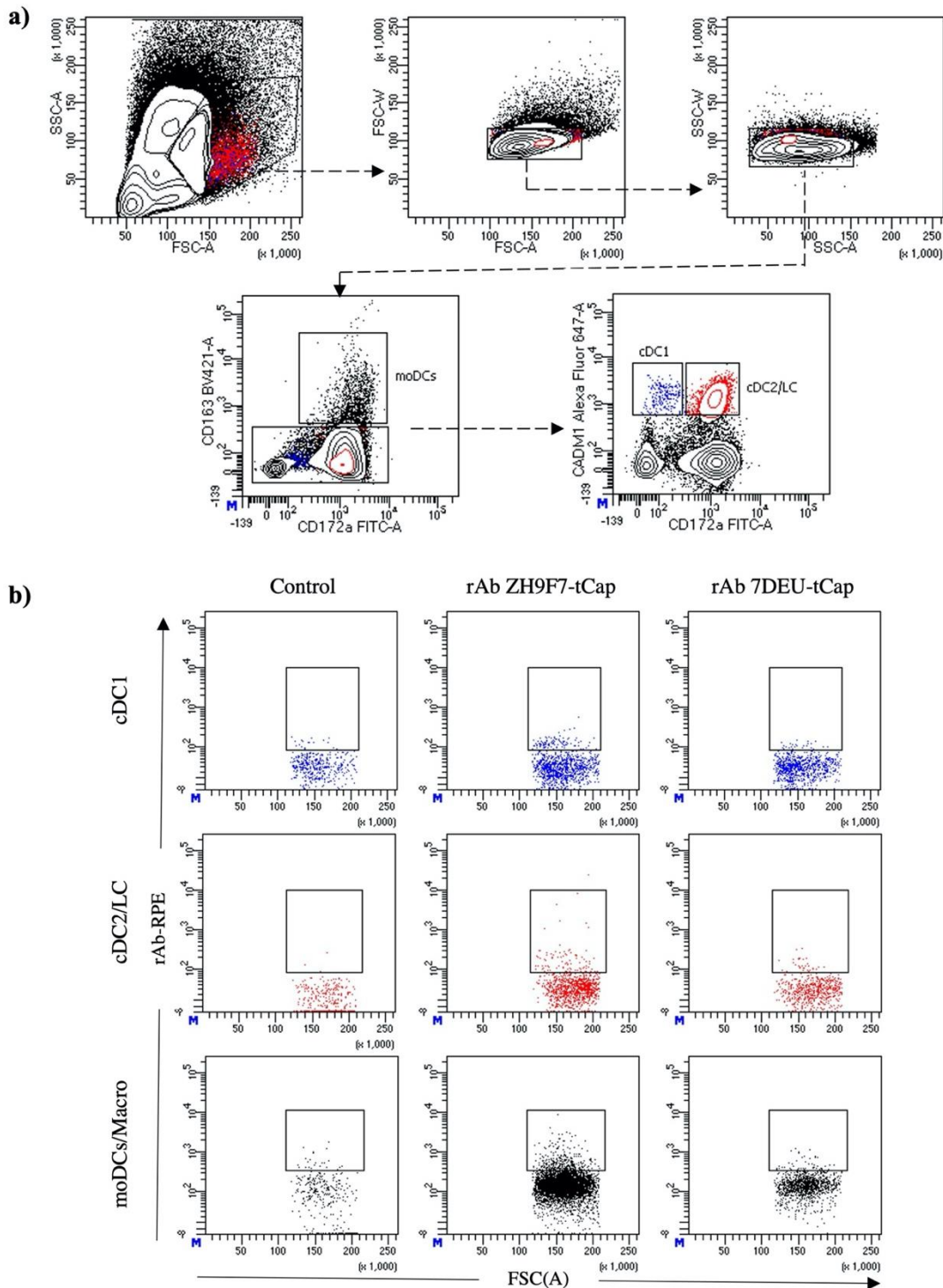


Figura 20. Reconocimiento de cDC1, cDC2/LC y moDC/Macro DEC205⁺ en piel por rAb ZH9F7-Cap. a) Estrategia de identificación de potenciales moDC/Macro, cDC1 y cDC2/LC en células migratorias de explantes de piel. b) Determinación de células DEC205⁺ positivas a la tinción con el rAb ZH9F7-tCap y control de isotipo rAb 7DEU-tCap *in vivo* (resultados representativos de 1 de 3 experimentos independientes).

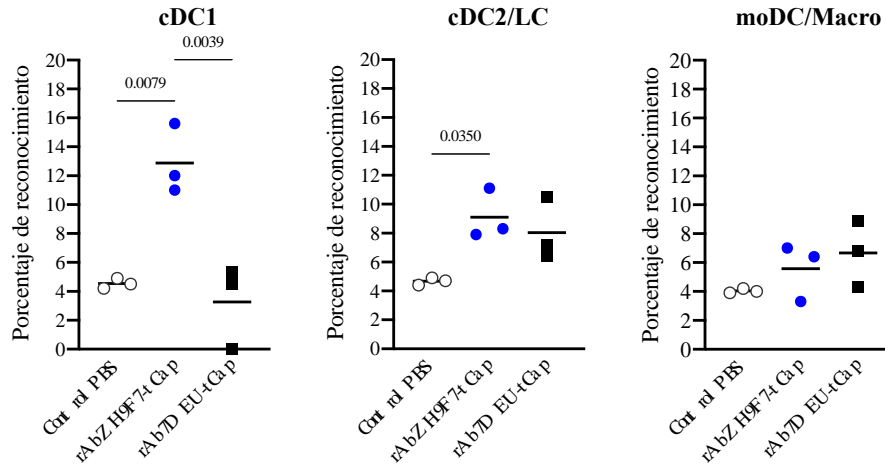


Figura 21. Porcentajes de reconocimiento de cDC1, cDC2/LC y moDCs/Macro por la tinción con el rAb ZH9F7-tCap y control de isotipo rAb 7DEU-tCap. Se realizó ANOVA de una vía seguido de comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer ($p < 0.05$). Los valores de p denotan diferencias estadísticamente significativas en las medias de los diferentes grupos.

La figura 22b muestra los gráficos de puntos representativos de uno de tres experimentos independientes. El direccionamiento con el rAb ZH9F7 denota la presencia de DCs, macrófagos y linfocitos teñidos con el rAb ZH9F7-tCap positivos al marcaje en ganglios linfáticos inguinales, contrario a ambos grupos controles isotipo y control PBS. De manera complementaria, se observa la presencia de DCs, macrófagos y linfocitos teñidos con rAb ZH9F7-tCap en el ganglio linfático inguinal derecho, cercano al sitio de aplicación. Por lo tanto, en esta segunda etapa de evaluación *in vivo* nos enfocamos en analizar ganglios linfáticos locales al sitio de aplicación de los diferentes tratamientos. La figura 23 muestra los porcentajes promedio de DCs, macrófagos y linfocitos. La presencia de DCs teñidas en ganglio linfático del grupo rAb ZH9F7-tCap fue alrededor del 12.33%, significativamente mayor al grupo control PBS (2.73%) y control de isotipo rAb 7DEU-tCap (5.83%). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre macrófagos y linfocitos marcados en ningún grupo ($p > 0.05$). De esta forma, se confirma que la aplicación intradérmica del rAb ZH9F7-tCap permitió el rastreo de posibles DCs DEC205⁺ que fueron posiblemente teñidas en piel y alcanzaron el ganglio linfático regional.

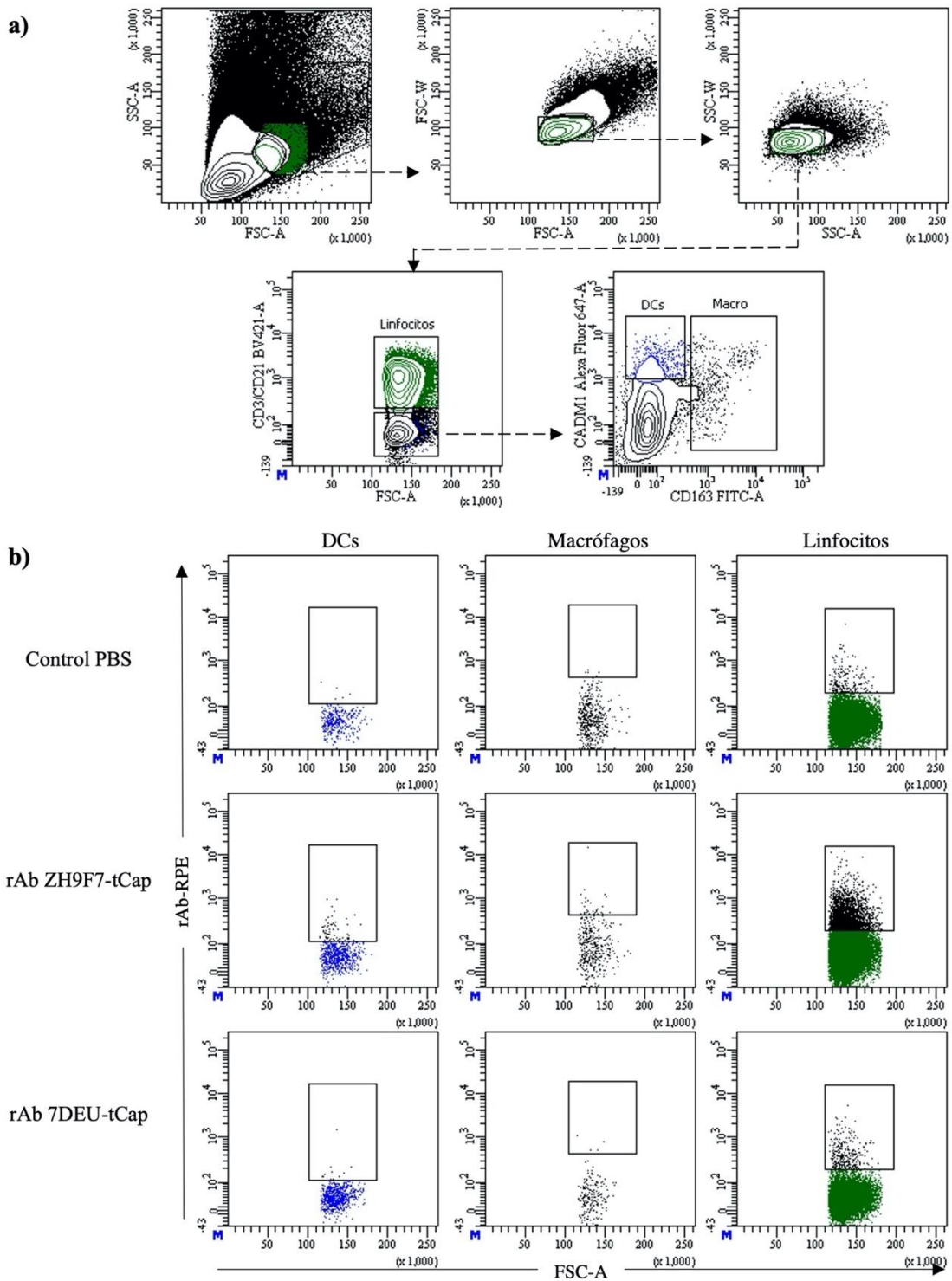


Figura 22. Identificación de DCs, macrófagos y linfocitos de ganglios linfáticos inguinales teñidos con el rAb ZH9F7-tCap. a) Estrategia para identificar linfocitos, DCs y macrófagos en ganglio linfático inguinal. b) Determinación de células DEC205⁺ positivas a la tinción con el rAb ZH9F7-tCap y control de isotipo rAb 7DEU-tCap *in vivo* (resultados representativos de 1 de al menos 3 experimentos independientes).

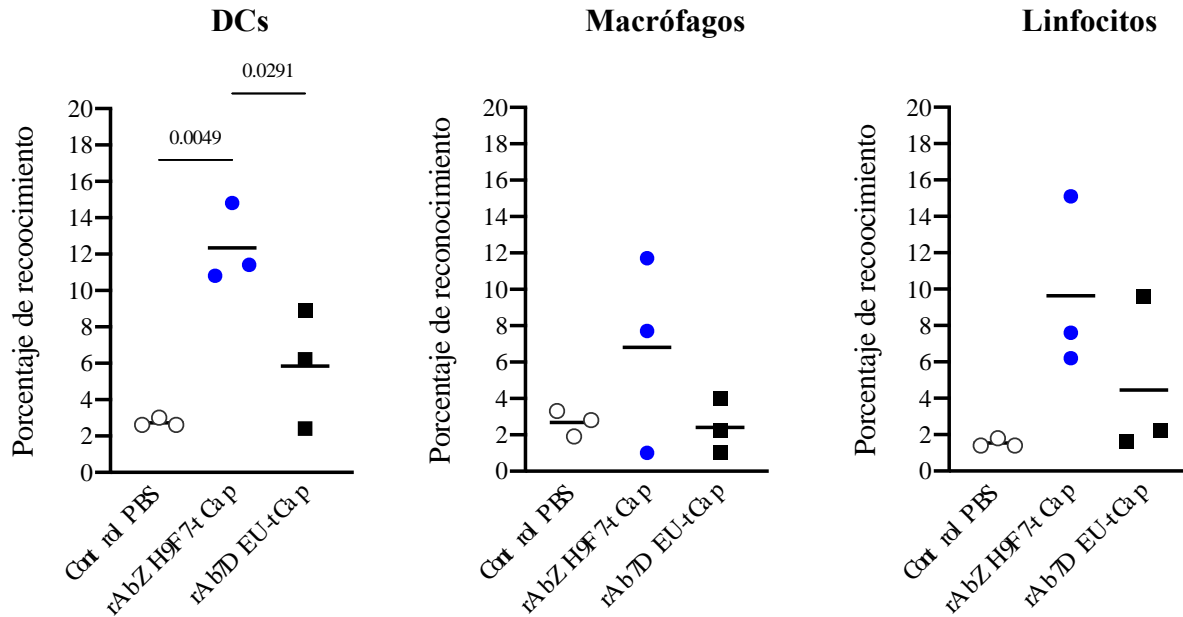


Figura 23. Porcentaje de DCs, macrófagos y linfocitos de ganglio linfático inguinal teñidos con el rAb ZH9F7-tCap. Representación del porcentaje de DCs, macrófagos y linfocitos en ganglio linfático positivos a la tinción con rAb ZH9F7-tCap y control de isotipo rAb 7DEU-tCap *in vivo*. Se realizó ANOVA de una vía seguido de comparación de medias por prueba de Tukey-Kramer ($p < 0.05$). Los valores de p denotan diferencias estadísticamente significativas en las medias de los diferentes grupos.

6.9. Evaluación de la Respuesta Celular y Humoral Inducida por el rAb ZH9F7-tCap

Como análisis preliminar evaluamos la respuesta humoral y celular inducida después de la aplicación intradérmica del rAb ZH9F7-tCap. Después de que las células fueron cosechadas, teñidas y adquiridas, las poblaciones $CD4\alpha^+CD8\alpha^-$, $CD4\alpha^-CD8\alpha^+$, y $CD4\alpha^+CD8\alpha^+$ productoras de IFN- γ fueron identificadas como se muestra en la figura 24. Para ello, primeramente, identificamos las diferentes poblaciones de linfocitos T, discerniendo entre linfocitos T $CD4\alpha^+CD8\alpha^-$, $CD4\alpha^-CD8\alpha^+$ y los doble positivos $CD4\alpha^+CD8\alpha^+$ (figura 24a). Esta última población ha sido caracterizada como una gran fracción de los linfocitos T que se encuentran en circulación sanguínea en cerdo, en un estado maduro, alcanzando hasta el 60%. (Overgaard *et al.*, 2015). Cuando diferentes poblaciones de linfocitos T fueron identificadas, se evaluó su respuesta en la producción de IFN- γ en respuesta a la estimulación *in vitro* con PHA, rAb ZH9F7-tCap y rAb ZH9F7 (figura 24b).

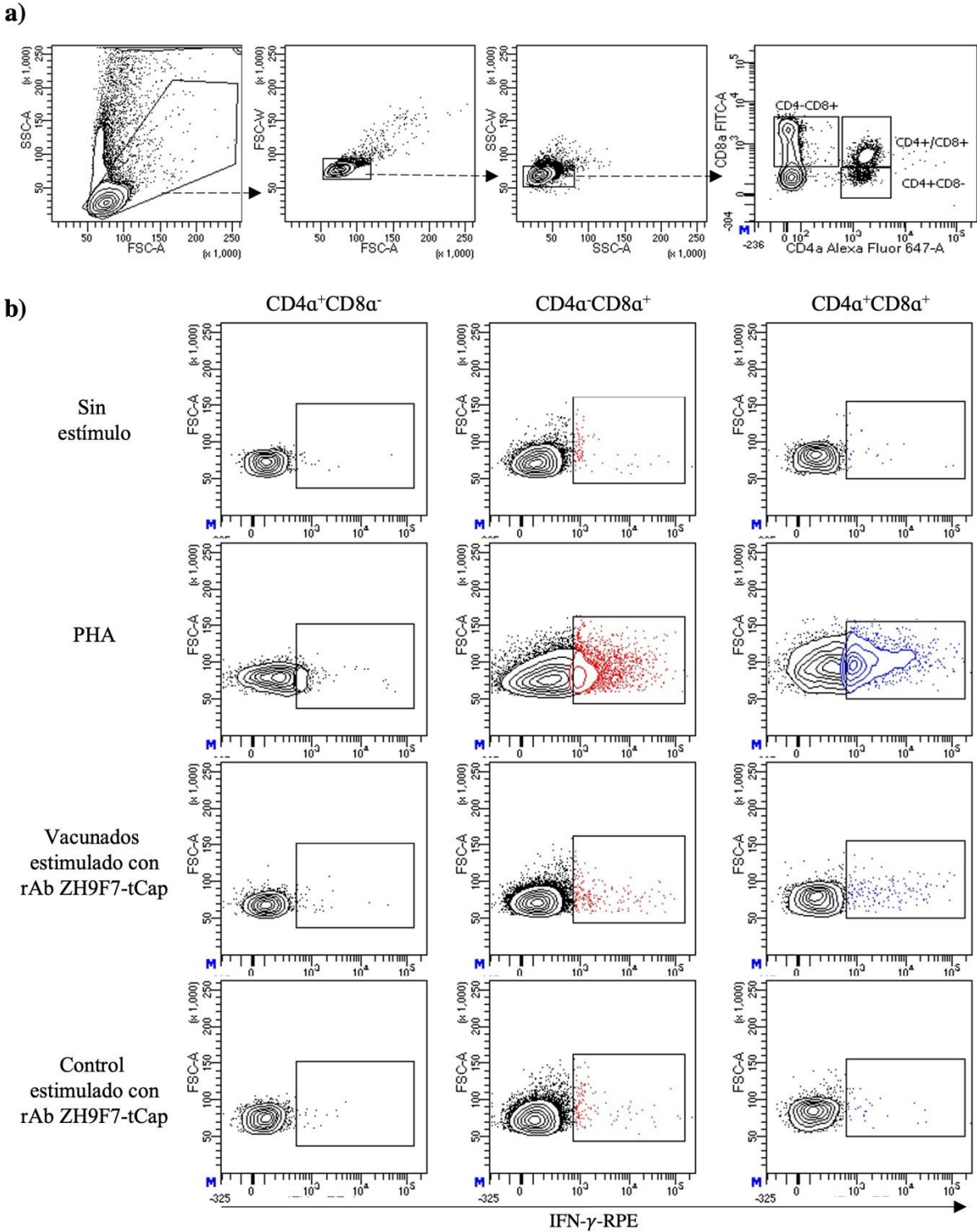


Figura 24. Linfocitos T productores de IFN- γ en respuesta a la estimulación *in vitro* con rAb ZH9F7-tCap en el grupo no vacunado y vacunado con rAb ZH9F7-tCap. a) Identificación de las subpoblaciones de linfocitos T. b) Gráficos de densidad que representan el IFN- γ intracelular en poblaciones CD4 α^+ CD8 α^- , CD4 α^- CD8 α^+ y CD4 α^+ CD8 α^+ , sin estimular, estimuladas con PHA, rAb ZH9F7-tCap del grupo vacuna y rAb ZH9F7-tCap del grupo control sin vacunar.

La figura 25 muestra la respuesta en producción de IFN- γ en las 3 poblaciones, en respuesta a los estímulos. Después de evaluar la producción de IFN- γ en respuesta a un mitógeno selectivo de linfocitos T como la fitohemaglutinina (PHA), las células CD4⁺CD8⁺ mostraron mayor capacidad de producción de IFN- γ , significativamente mayor ($p < 0.05$) que las poblaciones CD4⁻CD8⁺ y CD4⁺CD8⁻ en ambos grupos. Esta población representa un papel importante en respuesta a infecciones virales en cerdos debido a la fuerte respuesta de memoria que desempeña (Chung *et al.*, 2018). Sin embargo, cuando las células fueron estimuladas con el rAb ZH9F7-tCap, únicamente la población de CD4⁺CD8⁺ del grupo vacunado mostró una mayor capacidad en la producción de IFN- γ , alrededor del 4%, la cual fue estadísticamente diferente comparada con el resto de las subpoblaciones dentro del mismo o el otro grupo.

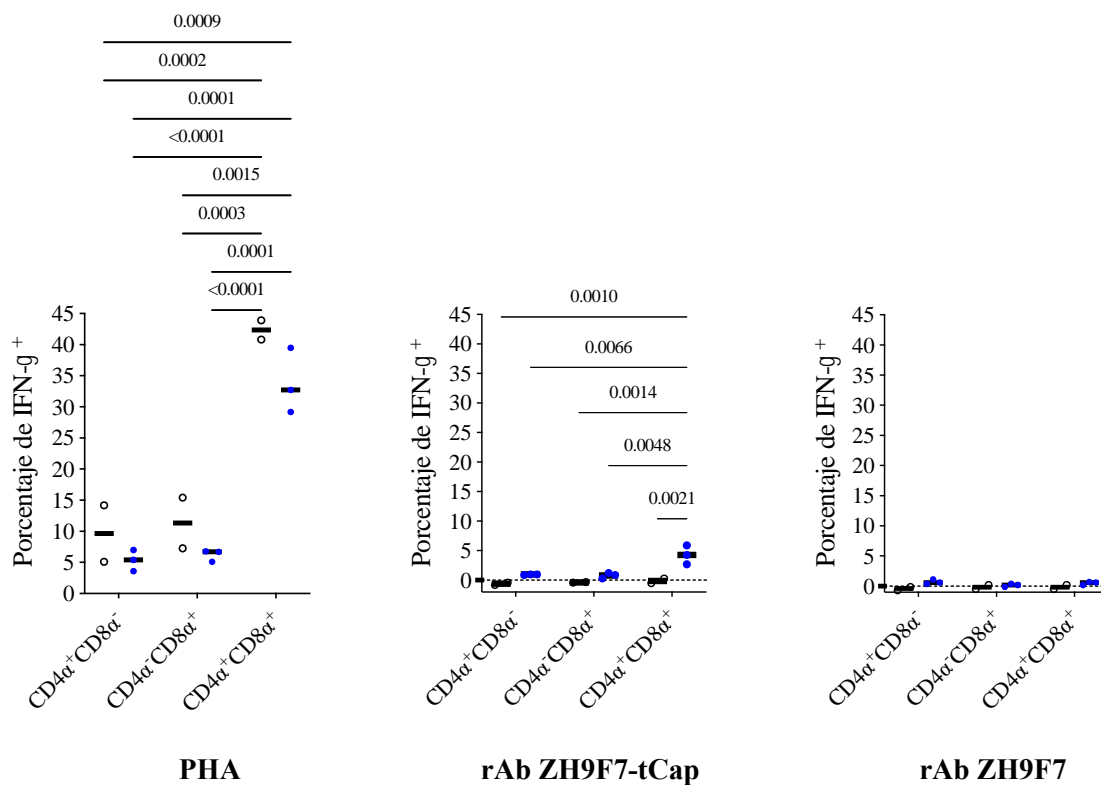


Figura 25. Representación de los porcentajes de células IFN- γ ⁺ por las poblaciones CD4 α ⁺CD8 α ⁻, CD4 α ⁻CD8 α ⁺ y CD4 α ⁺CD8 α ⁺. Los puntos blancos representan las células del grupo de control (n=2) y los azules representan las células del grupo vacunado con el rAb ZH9F7-tCap (n=3) a las cuales se les substrajo la expresión basal de IFN- γ del control sin estimular. Se realizó ANOVA de dos vías seguido de prueba Tukey-Kramer para comparación múltiple de medias ($p < 0.05$). Los valores de p denotan diferencias estadísticamente significativas en las medias de los diferentes tratamientos.

Cuando las células fueron estimuladas con el anticuerpo rAb ZH9F7 sin antígeno Cap, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la producción de IFN- γ en las poblaciones de linfocitos T CD4⁺CD8⁻, CD4⁻CD8⁺ y CD4⁺CD8⁺ del grupo vacunado y el no vacunado ($p > 0.05$). De esta forma, podemos decir que la estimulación *in vitro* fue desencadenada mayormente debido a la presencia del antígeno Cap en el rAb ZH9F7-tCap y no por secuencias en el anticuerpo recombinante quimérico rAb ZH9F7.

En la evaluación de la respuesta de vacunas de subunidad de PCV2, se ha encontrado que promueven inmunidad duradera mediada por linfocitos T CD4⁺CD8⁺ productores de IFN- γ e incluso, dobles productoras junto a TNF- α (Ferrari *et al.*, 2014; Koinig *et al.*, 2015). La expresión de CD8⁺ en la población de linfocitos T CD4 además de estar asociado a un perfil productor de IFN- γ , se asocia con células T activadas y de memoria (central y efectora) que en algunos casos de reinfección por PRRSV muestra una respuesta antiviral temprana (Chung *et al.*, 2018; Koinig *et al.*, 2015; Saalmüller *et al.*, 2002). La respuesta inmune humoral desencadenada por la aplicación intradérmica en zona inguinal del rAb ZH9F7-tCap fue evaluada cuatro semanas post-inyección. El esquema de vacunación se presenta en la figura 26a. La gráfica en la figura 26b representa los niveles de IgG anti-Cap del PCV2a. Una semana después de la aplicación del refuerzo (semana 4) hubo un incremento en el título de anticuerpos anti-Cap en el grupo vacunado con el rAb ZH9F7-tCap, el cual fue estadísticamente mayor al grupo control ($p < 0.05$).

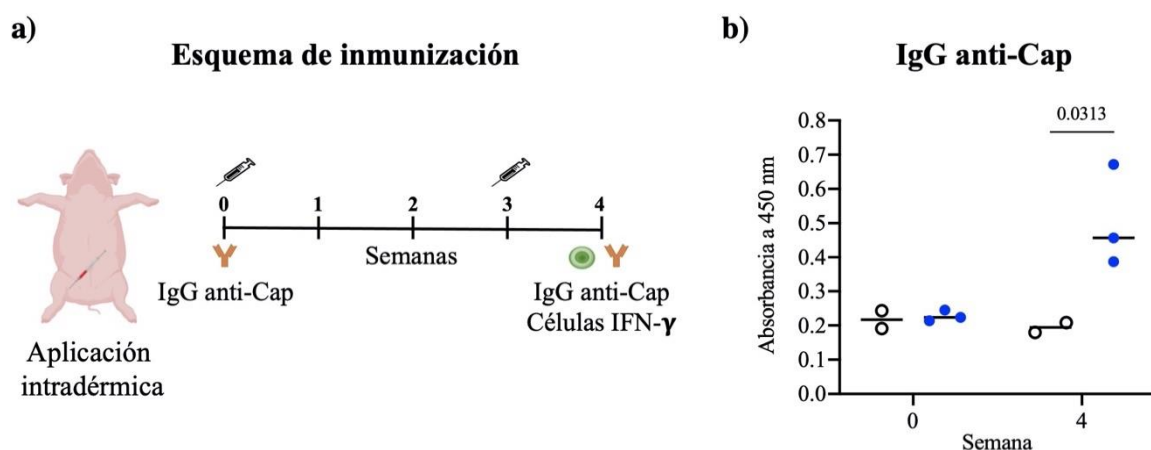


Figura 26. Esquema de inmunización y determinación de respuesta humoral. a) Esquema de inmunización y toma de muestra en el bioensayo de direccionamiento de antígeno Cap. b) Determinación de anticuerpos IgG específicos a Cap de PCV2 a través de ELISA indirecto. Los círculos blancos representan el grupo control y azules el grupo vacuna rAb ZH9F7-tCap. El valor p indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en la media de absorbancias entre los grupos.

Una gran ventaja y la apuesta principal del uso de anticuerpos quiméricos como el rAb ZH9F7 en lugar del monoclonal, es la posibilidad de reducir la antigenicidad de las regiones murinas, cuando se evalúa en otras especies como humanos o cerdos (Bustamante-Córdova *et al.*, 2021). Por lo tanto, cuando utilizamos el anticuerpo rAb ZH9F7 sin antígeno Cap para evaluar la estimulación *in vitro*, confirmamos que por sí mismo, el anticuerpo quimérico no indujo la estimulación de células productoras de IFN- γ en respuesta a las regiones murinas. De esta forma, es importante resaltar la ventaja del uso de anticuerpos híbridos en herramientas profilácticas o terapéuticas, reduciendo la respuesta inmune hacia ellos mismos al ser usado en especies distintas.

Adicionalmente, niveles detectables de anticuerpos anti-Cap de PCV2a fueron encontrados en el grupo vacunado con el rAb ZH9F7-tCap una semana después de la aplicación del refuerzo, aunque no se encontró una respuesta tan robusta como se esperaba. Esto denota la necesidad de modificar el esquema de vacunación que probamos, incrementando la dosis de antígeno direccionado o aumentando el número de aplicaciones de refuerzo para potenciar la respuesta humoral. Por lo anterior, se vuelve indispensable probar diferentes esquemas de vacunación de direccionamiento con este u otros antígenos.

Cabe señalar que en los experimentos de direccionamiento *in vivo*, las cDC1 de piel presentaron una mayor posibilidad de ser teñidas con las variantes del rAb ZH9F7 evaluadas *in situ*, posiblemente perfilando la respuesta Th1. Con ello, en la evaluación de la respuesta celular, la generación de linfocitos T CD4⁺CD8⁺ IFN- γ ⁺ representa una respuesta de células T CD4⁺ activadas con un perfil Th1 que expresan de forma simultánea el receptor CD8 α (Gerner *et al.*, 2015). Inferimos que, aunque no se ha evaluado el acceso a la maquinaria MHC-I después de la internalización rAb ZH9F7-DEC205, durante la presentación de antígenos fueron activados en mayor proporción los linfocitos T CD4⁺. Por lo tanto, para el caso del modelo estudiado y bajo la estrategia empleada, el direccionamiento a DEC205 porcino en nuestro sistema no favoreció la presentación cruzada vía MHC-I por lo que la activación de linfocitos T CD8⁺ no fue beneficiada. Los resultados presentados en esta tesis doctoral han sido publicados bajo el título “Antigen Targeting of Porcine Skin DEC205⁺ Dendritic Cells” doi.org/10.3390/vaccines10050684.

7. CONCLUSIONES

- En el modelo porcino, la expresión de DEC205 no se encuentra restringida a DCs, por lo que, el direccionamiento de antígenos *in vitro* e *in vivo* mostró un efecto no solo en las DCs sino también sobre monocitos, moDCs, macrófagos y linfocitos.
- La aplicación intradérmica del rAb ZH9F7 reconoció células cDC1, cDC2/LC, moDC/Macro y linfocitos en células migratorias de piel y ganglios linfáticos regionales. Sin embargo, hubo una mayor capacidad de marcaje a la población cDC1 dérmicas las cuales se han caracterizado con una mayor expresión de DEC205 y capacidad de inducir la polarización a la respuesta Th1.
- El direccionamiento a DCs DEC205⁺ de cerdo no promovió la presentación cruzada, lo cual se comprobó por un mayor efecto en la estimulación de linfocitos T CD4⁺ CD8⁺, los cuales han sido reconocidos como linfocitos T CD4⁺ de memoria.
- El direccionamiento de la Cap de PCV2 usando el rAb ZH9F7 permitió inducir una respuesta mediada por linfocitos T CD4⁺CD8⁺ productores de IFN- γ , lo cual concuerda con la tendencia de direccionamiento a la población cDC1 con capacidad de inducción de respuesta Th1.

8. RECOMENDACIONES

- Identificar los dominios de unión con receptores Fc y modificarlos, para neutralizar el reconocimiento por receptores Fc. Otra alternativa sería la utilización de un anticuerpo carente de dominio Fc, como el caso de los anticuerpos de cadena sencilla scFv, los cuales han sido ampliamente utilizados para ensayos de direccionamiento de antígenos, mostrando un efecto positivo en la estrategia.
- Una estrategia para incrementar la presencia de diferentes poblaciones de DCs en el sitio de aplicación para direccionamiento, es el uso de reclutadores de DCs como el ligando FLT3L, lo cual posibilitaría marcar más eficientemente a las DCs *in situ*. Cabe mencionar que durante el tiempo en que se realizó este proyecto, diseñamos, produjimos y purificamos distintas versiones del ligando FLT3L porcino (poFLT3L). En próximos ensayos es necesario evaluar la funcionalidad del poFLT3L para determinar si es capaz de reclutar mayor número de DCs al sitio e incrementar la eficiencia del direccionamiento a DCs DEC205⁺.
- Una vez optimizada la eficiencia y especificidad en el direccionamiento a DCs DEC205⁺ porcinas, es imprescindible evaluar su eficacia, contrastando los resultados obtenidos con un grupo experimental inmunizado con el antígeno Cap sin direccionar.
- Es necesario evaluar si la respuesta humoral y celular inducida por el direccionamiento hacia DCs DEC205⁺ porcinas es capaz de otorgar protección clínica ante un desafío viral en condiciones experimentales o de campo.

9. REFERENCIAS

- Alvarez, B., Poderoso, T., Alonso, F., Ezquerra, A., Dominguez, J., & Revilla, C. (2013). Antigen targeting to APC: from mice to veterinary species. *Developmental & Comparative Immunology*, *41*(2), 153-163.
- Artyomov, M. N., Munk, A., Gorvel, L., Korenfeld, D., Cella, M., Tung, T., & Klechevsky, E. (2015). Modular expression analysis reveals functional conservation between human Langerhans cells and mouse cross-priming dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, *212*(5), 743-757.
- Auray, G., Keller, I., Python, S., Gerber, M., Bruggmann, R., Ruggli, N., & Summerfield, A. (2016). Characterization and transcriptomic analysis of porcine blood conventional and plasmacytoid dendritic cells reveals striking species-specific differences. *The Journal of Immunology*, *197*(12), 4791-4806.
- Auray, G., Talker, S. C., Keller, I., Python, S., Gerber, M., Liniger, M., . . . Summerfield, A. (2020). High-resolution profiling of innate immune responses by porcine dendritic cell subsets in vitro and in vivo. *Frontiers in immunology*, *11*, 1429.
- Badillo-Godinez, O., Gutierrez-Xicotencatl, L., Plett-Torres, T., Pedroza-Saavedra, A., Gonzalez-Jaimes, A., Chihu-Amparan, L., . . . Esquivel-Guadarrama, F. (2015). Targeting of rotavirus VP6 to DEC-205 induces protection against the infection in mice. *Vaccine*, *33*(35), 4228-4237.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.-J., . . . Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology*, *18*(1), 767-811.
- Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, *392*(6673), 245-252.
- Bao, F., Mi, S., Luo, Q., Guo, H., Tu, C., Zhu, G., & Gong, W. (2018). Retrospective study of porcine circovirus type 2 infection reveals a novel genotype PCV 2f. *Transboundary and Emerging Diseases*, *65*(2), 432-440.
- Basha, G., Lizée, G., Reinicke, A. T., Seipp, R. P., Omilusik, K. D., & Jefferies, W. A. (2008). MHC class I endosomal and lysosomal trafficking coincides with exogenous antigen loading in dendritic cells. *PloS one*, *3*(9), e3247.
- Bedolla López, F., Trujillo Ortega, M. E., Mendoza Elvira, S., Quintero Ramírez, V., Alonso Morales, R., Ramírez-Mendoza, H., & Sanchez-Betancourt, J. I. (2018). Identification and genotyping of porcine circovirus type II (PCV2) in Mexico. *VirusDisease*, *29*(3), 385-389.
- Bedoui, S., Whitney, P. G., Waithman, J., Eidsmo, L., Wakim, L., Caminschi, I., . . . Carbone, F. R. (2009). Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nature immunology*, *10*(5), 488-495.
- Bellmann, L., Strandt, H., Zelle-Rieser, C., Ortner, D., Tripp, C. H., Schmid, S., . . . Prokopi, A. (2021). Targeted delivery of a vaccine protein to Langerhans cells in the human skin via the C-type lectin receptor Langerin. *European Journal of Immunology*.

- Bertholet, S., Goldszmid, R., Morrot, A., Debrabant, A., Afrin, F., Collazo-Custodio, C., . . . Sacks, D. (2006). Leishmania antigens are presented to CD8+ T cells by a transporter associated with antigen processing-independent pathway in vitro and in vivo. *The Journal of Immunology*, *177*(6), 3525-3533.
- Bhardwaj, N., Friedlander, P. A., Pavlick, A. C., Ernstoff, M. S., Gastman, B. R., Hanks, B. A., . . . Blazquez, A. B. (2020). Flt3 ligand augments immune responses to anti-DEC-205-NY-ESO-1 vaccine through expansion of dendritic cell subsets. *Nature Cancer*, *1*(12), 1204-1217.
- Birkholz, K., Schwenkert, M., Kellner, C., Gross, S., Fey, G., Schuler-Thurner, B., . . . Dörrie, J. (2010). Targeting of DEC-205 on human dendritic cells results in efficient MHC class II-restricted antigen presentation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *116*(13), 2277-2285.
- Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M. C., & Steinman, R. M. (2002). Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *Journal of Experimental Medicine*, *196*(12), 1627-1638.
- Bonifaz, L. C., Bonnyay, D. P., Charalambous, A., Darguste, D. I., Fujii, S.-I., Soares, H., . . . Steinman, R. M. (2004). In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *The Journal of experimental medicine*, *199*(6), 815-824.
- Briseño, C. G., Gargaro, M., Durai, V., Davidson, J. T., Theisen, D. J., Anderson III, D. A., . . . Murphy, K. M. (2017). Deficiency of transcription factor RelB perturbs myeloid and DC development by hematopoietic-extrinsic mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(15), 3957-3962.
- Bustamante-Córdova, L., Melgoza-González, E. A., Parra-Sánchez, H., Reséndiz-Sandoval, M., Burgara-Estrella, A. J., & Hernández, J. (2021). Production of a full chimeric mouse x pig anti-porcine DEC205 receptor recombinant antibody. *Journal of Immunological Methods*, *489*, 112911.
- Bustamante-Córdova, L., Reséndiz-Sandoval, M., & Hernández, J. (2019). Evaluation of a Recombinant Mouse X Pig Chimeric Anti-Porcine DEC205 Antibody Fused with Structural and Nonstructural Peptides of PRRS Virus. *Vaccines*, *7*(2), 43.
- Butler, M., Morel, A. S., Jordan, W. J., Eren, E., Hue, S., Shrimpton, R. E., & Ritter, M. A. (2007). Altered expression and endocytic function of CD205 in human dendritic cells, and detection of a CD205-DCL-1 fusion protein upon dendritic cell maturation. *Immunology*, *120*(3), 362-371.
- Cao, L., Chang, H., Shi, X., Peng, C., & He, Y. (2016). Keratin mediates the recognition of apoptotic and necrotic cells through dendritic cell receptor DEC205/CD205. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(47), 13438-13443.
- Chrun, T., Lacôte, S., Urien, C., Jouneau, L., Barc, C., Bouguyon, E., . . . Busquets, N. (2018). A Rift Valley fever virus Gn ectodomain-based DNA vaccine induces a partial protection not improved by APC targeting. *npj Vaccines*, *3*(1), 1-13.
- Chung, C. J., Cha, S.-H., Grimm, A. L., Ajithdoss, D., Rzepka, J., Chung, G., . . . Ho, C.-S. (2018).

Pigs that recover from porcine reproduction and respiratory syndrome virus infection develop cytotoxic CD4⁺ CD8⁺ and CD4⁺ CD8⁻T-cells that kill virus infected cells. *PloS one*, 13(9), e0203482.

- Cisse, B., Caton, M. L., Lehner, M., Maeda, T., Scheu, S., Locksley, R., . . . Kant, S. G. (2008). Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell*, 135(1), 37-48.
- Clark, G. J., Angel, N., Kato, M., López, J. A., MacDonald, K., Vuckovic, S., & Hart, D. N. (2000). The role of dendritic cells in the innate immune system. *Microbes and infection*, 2(3), 257-272.
- Coillard, A., & Segura, E. (2021). Antigen presentation by mouse monocyte-derived cells: Re-evaluating the concept of monocyte-derived dendritic cells. *Molecular Immunology*, 135, 165-169.
- Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I., & Trombetta, E. S. (2005). Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science*, 307(5715), 1630-1634.
- Deloizy, C., Fossum, E., Barnier-Quer, C., Urien, C., Chrun, T., Duval, A., . . . Hervé, P.-L. (2017). The anti-influenza M2e antibody response is promoted by XCR1 targeting in pig skin. *Scientific reports*, 7(1), 1-12.
- Delputte, P. L., Van Gorp, H., Favoreel, H. W., Hoebcke, I., Delrue, I., Dewerchin, H., . . . Nauwynck, H. J. (2011). Porcine sialoadhesin (CD169/Siglec-1) is an endocytic receptor that allows targeted delivery of toxins and antigens to macrophages. *PloS one*, 6(2).
- Di Pucchio, T., Chatterjee, B., Smed-Sørensen, A., Clayton, S., Palazzo, A., Montes, M., . . . Connolly, J. E. (2008). Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nature immunology*, 9(5), 551-557.
- Ebner, S., Ehammer, Z., Holzmann, S., Schwingshackl, P., Forstner, M., Stoitzner, P., . . . Romani, N. (2004). Expression of C-type lectin receptors by subsets of dendritic cells in human skin. *International immunology*, 16(6), 877-887.
- Edwards, J. C., Everett, H. E., Pedrera, M., Mokhtar, H., Marchi, E., Soldevila, F., . . . Nunez-Garcia, J. (2017). CD1⁻ and CD1⁺ porcine blood dendritic cells are enriched for the orthologues of the two major mammalian conventional subsets. *Scientific reports*, 7(1), 1-14.
- Ellis, J. (2014). Porcine circovirus: a historical perspective. *Veterinary pathology*, 51(2), 315-327.
- Embgenbroich, M., & Burgdorf, S. (2018). Current concepts of antigen cross-presentation. *Frontiers in immunology*, 9, 1643.
- Fadilah, S., & Cheong, S. (2007). Dendritic cell immunobiology and potential roles in immunotherapy. *Malaysian Journal of Pathology*, 29(1), 1.
- Fehres, C. M., Duinkerken, S., Bruijns, S., Kalay, H., Van Vliet, S. J., Ambrosini, M., . . . Van Kooyk, Y. (2017). Langerin-mediated internalization of a modified peptide routes antigens to early endosomes and enhances cross-presentation by human Langerhans cells. *Cellular & molecular immunology*, 14(4), 360-370.

- Ferrari, L., Borghetti, P., De Angelis, E., & Martelli, P. (2014). Memory T cell proliferative responses and IFN- γ productivity sustain long-lasting efficacy of a Cap-based PCV2 vaccine upon PCV2 natural infection and associated disease. *Veterinary research*, *45*(1), 1-16.
- Figdor, C. G., Van Kooyk, Y., & Adema, G. J. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nature Reviews Immunology*, *2*(2), 77-84.
- Flacher, V., Tripp, C. H., Haid, B., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Stoitzner, P., . . . Romani, N. (2012). Skin Langerin+ Dendritic Cells Transport Intradermally Injected Anti-DEC-205 Antibodies but Are Not Essential for Subsequent Cytotoxic CD8+ T Cell Responses. *The Journal of Immunology*, *188*(5), 2146-2155.
- Flacher, V., Tripp, C. H., Stoitzner, P., Haid, B., Ebner, S., Del Frari, B., . . . Idoyaga, J. (2010). Epidermal Langerhans cells rapidly capture and present antigens from C-type lectin-targeting antibodies deposited in the dermis. *Journal of Investigative Dermatology*, *130*(3), 755-762.
- Flores-Mendoza, L., Sotelo-Mundo, R. R., Dawson, H., Mwangi, W., & Hernández, J. (2010). Characterization of porcine CD205. *Developmental & Comparative Immunology*, *34*(7), 715-721.
- Flores-Mendoza, L., Velazquez, C., Bray, J., Njongmeta, L., Mwangi, W., & Hernández, J. (2012). Development and characterization of a monoclonal antibody against porcine CD205. *Veterinary immunology and immunopathology*, *146*(1), 74-80.
- Fort, M., Sibila, M., Nofrarías, M., Pérez-Martín, E., Olvera, A., Mateu, E., & Segalés, J. (2010). Porcine circovirus type 2 (PCV2) Cap and Rep proteins are involved in the development of cell-mediated immunity upon PCV2 infection. *Veterinary immunology and immunopathology*, *137*(3-4), 226-234.
- Fossum, E., Grødeland, G., Terhorst, D., Tveita, A. A., Vikse, E., Mjaaland, S., . . . Bogen, B. (2015). Vaccine molecules targeting Xcr1 on cross-presenting DCs induce protective CD8+ T-cell responses against influenza virus. *European journal of immunology*, *45*(2), 624-635.
- Franzo, G., Cortey, M., Olvera, A., Novosel, D., De Castro, A. M. M. G., Biagini, P., . . . Drigo, M. (2015). Revisiting the taxonomical classification of Porcine Circovirus type 2 (PCV2): still a real challenge. *Virology journal*, *12*(1), 1-8.
- Franzo, G., Cortey, M., Segalés, J., Hughes, J., & Drigo, M. (2016). Phylodynamic analysis of porcine circovirus type 2 reveals global waves of emerging genotypes and the circulation of recombinant forms. *Molecular phylogenetics and evolution*, *100*, 269-280.
- Franzoni, G., Graham, S. P., Dei Giudici, S., & Oggiano, A. (2019). Porcine Dendritic Cells and Viruses: An Update. *Viruses*, *11*(5), 445.
- Fujita, H., Nogales, K. E., Kikuchi, T., Gonzalez, J., Carucci, J. A., & Krueger, J. G. (2009). Human Langerhans cells induce distinct IL-22-producing CD4+ T cells lacking IL-17 production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(51), 21795-21800.
- Gerber, P. F., Johnson, J., Shen, H., Striegel, D., Xiao, C.-T., Halbur, P. G., & Opriessnig, T. (2013). Association of concurrent porcine circovirus (PCV) 2a and 2b infection with PCV associated disease in vaccinated pigs. *Research in veterinary science*, *95*(2), 775-781.
- Gillespie, J., Opriessnig, T., Meng, X., Pelzer, K., & Buechner-Maxwell, V. (2009). Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. *Journal of veterinary internal*

medicine, 23(6), 1151-1163.

- Ginhoux, F., Liu, K., Helft, J., Bogunovic, M., Greter, M., Hashimoto, D., . . . Lira, S. A. (2009). The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *Journal of Experimental Medicine*, 206(13), 3115-3130.
- Ginhoux, F., & Merad, M. (2010). Ontogeny and homeostasis of Langerhans cells. *Immunology and cell biology*, 88(4), 387-392.
- Guo, L., Lu, Y., Wei, Y., Huang, L., Wu, H., & Liu, C. (2011). Porcine circovirus genotype 2a (PCV2a) and genotype 2b (PCV2b) recombinant mutants showed significantly enhanced viral replication and altered antigenicity in vitro. *Virology*, 419(2), 57-63.
- Guo, M., Gong, S., Maric, S., Misulovin, Z., Pack, M., Mahnke, K., . . . Steinman, R. M. (2000). A monoclonal antibody to the DEC-205 endocytosis receptor on human dendritic cells. *Human immunology*, 61(8), 729-738.
- Harmon, K. M., Gauger, P. C., Zhang, J., Piñeyro, P. E., Dunn, D. D., & Chriswell, A. J. (2015). Whole-genome sequences of novel porcine circovirus type 2 viruses detected in swine from Mexico and the United States. *Genome announcements*, 3(6), e01315-01315.
- Harpur, C. M., Kato, Y., Dewi, S. T., Stankovic, S., Johnson, D. N., Bedoui, S., . . . Heath, W. R. (2019). Classical type 1 dendritic cells dominate priming of Th1 responses to herpes simplex virus type 1 skin infection. *The Journal of Immunology*, 202(3), 653-663.
- Hildner, K., Edelson, B. T., Purtha, W. E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., . . . Diamond, M. S. (2008). Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8 α + dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science*, 322(5904), 1097-1100.
- Hou, Q., Hou, S., Chen, Q., Jia, H., Xin, T., Jiang, Y., . . . Zhu, H. (2018). Nuclear localization signal regulates porcine circovirus type 2 capsid protein nuclear export through phosphorylation. *Virus research*, 246, 12-22.
- Huang, Y., Shao, M., Xu, X., Zhang, X., Du, Q., Zhao, X., . . . Tong, D. (2013). Evidence for different patterns of natural inter-genotype recombination between two PCV2 parental strains in the field. *Virus research*, 175(1), 78-86.
- Idoyaga, J., Lubkin, A., Fiorese, C., Lahoud, M. H., Caminschi, I., Huang, Y., . . . Trumfheller, C. (2011). Comparable T helper 1 (Th1) and CD8 T-cell immunity by targeting HIV gag p24 to CD8 dendritic cells within antibodies to Langerin, DEC205, and Clec9A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(6), 2384-2389.
- Igyarto, B. Z., Jenison, M. C., Dudda, J. C., Roers, A., Müller, W., Koni, P. A., . . . Kaplan, D. H. (2009). Langerhans cells suppress contact hypersensitivity responses via cognate CD4 interaction and langerhans cell-derived IL-10. *The Journal of Immunology*, 183(8), 5085-5093.
- Iyoda, T., Shimoyama, S., Liu, K., Omatsu, Y., Akiyama, Y., Maeda, Y., . . . Inaba, K. (2002). The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 195(10), 1289-1302.
- Jiang, W., Swiggard, W. J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R. M., & Nussenzweig, M. C. (1995). The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature*, 375(6527), 151-155.

- Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A., & Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nature Reviews Immunology*, *12*(8), 557-569.
- Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G.-I., De los Santos, K., Sparwasser, T., . . . Zavala, F. (2002). In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity*, *17*(2), 211-220.
- Jáuregui-Zúñiga, D., Pedraza-Escalona, M., Espino-Solís, G. P., Quintero-Hernández, V., Olvera-Rodríguez, A., Díaz-Salinas, M. A., . . . Possani, L. D. (2017). Targeting antigens to DEC-205 on dendritic cells induces a higher immune response in chickens: Hemagglutinin of avian influenza virus example. *Research in veterinary science*, *111*, 55-62.
- Karuppanan, A. K., Jong, M. H., Lee, S.-H., Zhu, Y., Selvaraj, M., Lau, J., . . . Kwang, J. (2009). Attenuation of porcine circovirus 2 in SPF piglets by abrogation of ORF3 function. *Virology*, *383*(2), 338-347.
- Karuppanan, A. K., & Kwang, J. (2011). ORF3 of porcine circovirus 2 enhances the in vitro and in vivo spread of the virus. *Virology*, *410*(1), 248-256.
- Kato, M., McDonald, K. J., Khan, S., Ross, I. L., Vuckovic, S., Chen, K., . . . Hart, D. N. (2006). Expression of human DEC-205 (CD205) multilectin receptor on leukocytes. *International immunology*, *18*(6), 857-869.
- Kato, M., Neil, T. K., Clark, G. J., Morris, C. M., Sorg, R., & Hart, D. N. (1998). cDNA cloning of human DEC-205, a putative antigen-uptake receptor on dendritic cells. *Immunogenetics*, *47*(6), 442-450.
- Kato, Y., Steiner, T. M., Park, H.-Y., Hitchcock, R. O., Zaid, A., Hor, J. L., . . . Tullett, K. M. (2020). Display of native antigen on cDC1 that have spatial access to both T and B cells underlies efficient humoral vaccination. *The Journal of Immunology*, *205*(7), 1842-1856.
- Khayat, R., Wen, K., Alimova, A., Gavrillov, B., Katz, A., Galarza, J. M., & Gottlieb, P. (2019). Structural characterization of the PCV2d virus-like particle at 3.3 Å resolution reveals differences to PCV2a and PCV2b capsids, a tetranucleotide, and an N-terminus near the icosahedral 3-fold axes. *Virology*, *537*, 186-197.
- Kobayashi, D., Endo, M., Ochi, H., Hojo, H., Miyasaka, M., & Hayasaka, H. (2017). Regulation of CCR7-dependent cell migration through CCR7 homodimer formation. *Scientific reports*, *7*(1), 1-14.
- Koinig, H. C., Talker, S. C., Stadler, M., Ladinig, A., Graage, R., Ritzmann, M., . . . Saalmüller, A. (2015). PCV2 vaccination induces IFN- γ /TNF- α co-producing T cells with a potential role in protection. *Veterinary research*, *46*(1), 1-13.
- Lahoud, M. H., Ahmet, F., Zhang, J.-G., Meuter, S., Policheni, A. N., Kitsoulis, S., . . . Brooks, A. G. (2012). DEC-205 is a cell surface receptor for CpG oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(40), 16270-16275.
- Lauterbach, H., Bathke, B., Gilles, S., Traidl-Hoffmann, C., Lubber, C. A., Fejer, G., . . . Kallies, A. (2010). Mouse CD8 α + DCs and human BDCA3+ DCs are major producers of IFN- λ in response to poly IC. *Journal of Experimental Medicine*, *207*(12), 2703-2717.
- Lekcharoensuk, P., Morozov, I., Paul, P. S., Thangthumnyom, N., Wajjawalku, W., & Meng, X. (2004). Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by

using chimeric PCV1 and PCV2. *Journal of virology*, 78(15), 8135-8145.

- León, B., López-Bravo, M., & Ardavín, C. (2007). Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity*, 26(4), 519-531.
- Li, K., Bao, H., Wei, G., Li, D., Chen, Y., Fu, Y., . . . Bai, X. (2017). Molecular vaccine prepared by fusion of XCL1 to the multi-epitope protein of foot-and-mouth disease virus enhances the specific humoral immune response in cattle. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(21), 7889-7900.
- Lin, M. L., Zhan, Y., Proietto, A. I., Prato, S., Wu, L., Heath, W. R., . . . Lew, A. M. (2008). Selective suicide of cross-presenting CD8+ dendritic cells by cytochrome c injection shows functional heterogeneity within this subset. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), 3029-3034.
- Lin, W.-L., Chien, M.-S., Wu, P.-C., Lai, C.-L., & Huang, C. (2011). The porcine circovirus type 2 nonstructural protein ORF3 induces apoptosis in porcine peripheral blood mononuclear cells. *The open virology journal*, 5, 148.
- Liu, B. Y., Gao, B., Liu, M. Z., Zhang, T. T., Liu, B. S., & Chen, Z. L. (2020). High repetitive arginine in the anterior of PCV3 capsid protein is a severe obstacle for its expression in *E. coli*. *AMB Express*, 10(1), 1-7.
- Liu, J., Chen, I., Du, Q., Chua, H., & Kwang, J. (2006). The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. *Journal of virology*, 80(10), 5065-5073.
- Liu, J., Chen, I., & Kwang, J. (2005). Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *Journal of virology*, 79(13), 8262-8274.
- Liu, J., Tian, Z.-Y., Xiao, Y.-C., Wang, X.-L., Jin, M.-L., & Shi, D.-S. (2016). The role of porcine monocyte derived dendritic cells (MoDC) in the inflammation storm caused by *Streptococcus suis* serotype 2 infection. *PloS one*, 11(3), e0151256.
- Lo, M., Kim, H. S., Tong, R. K., Bainbridge, T. W., Vernes, J.-M., Zhang, Y., . . . Zuchero, Y. J. Y. (2017). Effector-attenuating substitutions that maintain antibody stability and reduce toxicity in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 292(9), 3900-3908.
- Lv, Q.-z., Guo, K.-k., & Zhang, Y.-m. (2014). Current understanding of genomic DNA of porcine circovirus type 2. *Virus genes*, 49(1), 1-10.
- Mahnke, K., Guo, M., Lee, S., Sepulveda, H., Swain, S. L., Nussenzweig, M., & Steinman, R. M. (2000). The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *The Journal of cell biology*, 151(3), 673-684.
- Marquet, F., Bonneau, M., Pascale, F., Urien, C., Kang, C., Schwartz-Cornil, I., & Bertho, N. (2011a). Characterization of dendritic cells subpopulations in skin and afferent lymph in the swine model. *PloS one*, 6(1).
- Marquet, F., Bonneau, M., Pascale, F., Urien, C., Kang, C., Schwartz-Cornil, I., & Bertho, N. (2011b). Characterization of dendritic cells subpopulations in skin and afferent lymph in the swine model. *PloS one*, 6(1), e16320.

- Marquet, F., Manh, T.-P. V., Maisonnasse, P., Elhmouzi-Younes, J., Urien, C., Bouguyon, E., . . . Ezquerro, A. (2014). Pig skin includes dendritic cell subsets transcriptomically related to human CD1a and CD14 dendritic cells presenting different migrating behaviors and T cell activation capacities. *The journal of immunology*, *193*(12), 5883-5893.
- Meehan, B. M., McNeilly, F., Todd, D., Kennedy, S., Jewhurst, V. A., Ellis, J. A., . . . Allan, G. M. (1998). Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *Journal of General Virology*, *79*(9), 2171-2179.
- Meixlsperger, S., Leung, C. S., Ramer, P. C., Pack, M., Vanoaica, L. D., Breton, G., . . . Schmitz, J. (2013). CD141+ dendritic cells produce prominent amounts of IFN- α after dsRNA recognition and can be targeted via DEC-205 in humanized mice. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *121*(25), 5034-5044.
- Melgoza Gonzalez, E. A. (2018). *Generaci3n de un anticuerpo recombinante anti-DEC205 porcino* Melgoza Gonzalez, Edgar Alonso; 786418].
- Misharin, A. V., Morales-Nebreda, L., Mutlu, G. M., Budinger, G. S., & Perlman, H. (2013). Flow cytometric analysis of macrophages and dendritic cell subsets in the mouse lung. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, *49*(4), 503-510.
- Mochizuki, K., Xie, F., He, S., Tong, Q., Liu, Y., Mochizuki, I., . . . Mineishi, S. (2013). Delta-like ligand 4 identifies a previously uncharacterized population of inflammatory dendritic cells that plays important roles in eliciting allogeneic T cell responses in mice. *The Journal of Immunology*, *190*(7), 3772-3782.
- Mouries, J., Moron, G., Schlecht, G., Escriou, N., Dadaglio, G., & Leclerc, C. (2008). Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *112*(9), 3713-3722.
- Mucksova, J., Plachy, J., Stanek, O., Hejnar, J., Kalina, J., Benešova, B., & Trefil, P. (2017). Cytokine response to the RSV antigen delivered by dendritic cell-directed vaccination in congenic chicken lines. *Veterinary research*, *48*(1), 1-14.
- Nawagitgul, P., Harms, P. A., Morozov, I., Thacker, B. J., Sorden, S. D., Lekcharoensuk, C., & Paul, P. S. (2002). Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. *Clinical and Vaccine Immunology*, *9*(1), 33-40.
- Neubert, K., Lehmann, C. H., Heger, L., Baranska, A., Staedtler, A. M., Buchholz, V. R., . . . Zebroski, H. (2014). Antigen delivery to CD11c+ CD8- dendritic cells induces protective immune responses against experimental melanoma in mice in vivo. *The Journal of Immunology*, *192*(12), 5830-5838.
- Nizzoli, G., Krietsch, J., Weick, A., Steinfeld, S., Facciotti, F., Gruarin, P., . . . Crosti, M. (2013). Human CD1c+ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *122*(6), 932-942.
- Njongmeta, L. M., Bray, J., Davies, C. J., Davis, W. C., Howard, C. J., Hope, J. C., . . . Mwangi, W. (2012). CD205 antigen targeting combined with dendritic cell recruitment factors and antigen-linked CD40L activation primes and expands significant antigen-specific antibody and CD4+ T cell responses following DNA vaccination of outbred animals. *Vaccine*, *30*(9), 1624-1635.

- O'Keeffe, M., Hochrein, H., Vremec, D., Caminschi, I., Miller, J. L., Anders, E. M., . . . Scott, B. (2002). Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8⁺ dendritic cells only after microbial stimulus. *The Journal of experimental medicine*, *196*(10), 1307-1319.
- Opriessnig, T., Meng, X.-J., & Halbur, P. G. (2007). Porcine circovirus type 2–associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *19*(6), 591-615.
- Opriessnig, T., Xiao, C.-T., Gerber, P. F., & Halbur, P. G. (2013). Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the US concurrently infected with PPV2. *Veterinary microbiology*, *163*(1-2), 177-183.
- Overgaard, N. H., Jung, J. W., Steptoe, R. J., & Wells, J. W. (2015). CD4⁺/CD8⁺ double-positive T cells: more than just a developmental stage? *Journal of leukocyte biology*, *97*(1), 31-38.
- Palinski, R., Piñeyro, P., Shang, P., Yuan, F., Guo, R., Fang, Y., . . . Hause, B. M. (2017). A novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure. *Journal of virology*, *91*(1), e01879-01816.
- Parra-Sánchez, H., Puebla-Clark, L., Reséndiz, M., Valenzuela, O., & Hernández, J. (2018). Characterization and expression of DEC205 in the cDC1 and cDC2 subsets of porcine dendritic cells from spleen, tonsil, and submaxillary and mesenteric lymph nodes. *Molecular immunology*, *96*, 1-7.
- Platt, C. D., Ma, J. K., Chalouni, C., Ebersold, M., Bou-Reslan, H., Carano, R. A., . . . Delamarre, L. (2010). Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(9), 4287-4292.
- Puebla-Clark, L., Parra-Sánchez, H., Reséndiz, M., Valenzuela, O., & Hernández, J. (2019). Tonsil conventional dendritic cells are not infected by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology*, *529*, 65-72.
- Rampazo, E. V., Amorim, K. N., Yamamoto, M. M., Panatieri, R. H., Rodrigues, M. M., & Boscardin, S. B. (2015). Antigen targeting to dendritic cells allows the identification of a CD4 T-cell epitope within an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *PLoS One*, *10*(2), e0117778.
- Romani, N., Clausen, B. E., & Stoitzner, P. (2010). Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunological reviews*, *234*(1), 120-141.
- Saalmüller, A., Werner, T., & Fachinger, V. (2002). T-helper cells from naive to committed. *Veterinary immunology and immunopathology*, *87*(3-4), 137-145.
- Saluja, S. S., Hanlon, D. J., Sharp, F. A., Hong, E., Khalil, D., Robinson, E., . . . Edelson, R. L. (2014). Targeting human dendritic cells via DEC-205 using PLGA nanoparticles leads to enhanced cross-presentation of a melanoma-associated antigen. *International journal of nanomedicine*, *9*, 5231.
- Savina, A., Jancic, C., Hugues, S., Guermonprez, P., Vargas, P., Moura, I. C., . . . Amigorena, S. (2006). NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell*, *126*(1), 205-218.

- Schlitzer, A., McGovern, N., Teo, P., Zelante, T., Atarashi, K., Low, D., . . . Wasan, P. S. (2013). IRF4 transcription factor-dependent CD11b⁺ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. *Immunity*, *38*(5), 970-983.
- Schlothauer, T., Herter, S., Koller, C. F., Grau-Richards, S., Steinhart, V., Spick, C., . . . Mössner, E. (2016). Novel human IgG1 and IgG4 Fc-engineered antibodies with completely abolished immune effector functions. *Protein Engineering, Design and Selection*, *29*(10), 457-466.
- Segura, E., Albiston, A. L., Wicks, I. P., Chai, S. Y., & Villadangos, J. A. (2009). Different cross-presentation pathways in steady-state and inflammatory dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(48), 20377-20381.
- Segura, E., Valladeau-Guilemond, J., Donnadieu, M.-H., Sastre-Garau, X., Soumelis, V., & Amigorena, S. (2012). Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *Journal of Experimental Medicine*, *209*(4), 653-660.
- Sengupta, A., Keswani, T., Sarkar, S., Ghosh, S., Mukherjee, S., & Bhattacharyya, A. (2019). Autophagic induction modulates splenic plasmacytoid dendritic cell mediated immune response in cerebral malarial infection model. *Microbes and infection*, *21*(10), 475-484.
- Shen, L., Sigal, L. J., Boes, M., & Rock, K. L. (2004). Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity*, *21*(2), 155-165.
- Shrestha, A., Sadeyen, J.-R., Lukosaityte, D., Chang, P., Van Hulten, M., & Iqbal, M. (2021). Targeting Haemagglutinin Antigen of Avian Influenza Virus to Chicken Immune Cell Receptors Dec205 and CD11c Induces Differential Immune-Potentiating Responses. *Vaccines*, *9*(7), 784.
- Shrimpton, R. E., Butler, M., Morel, A.-S., Eren, E., Hue, S. S., & Ritter, M. A. (2009). CD205 (DEC-205): a recognition receptor for apoptotic and necrotic self. *Molecular immunology*, *46*(6), 1229-1239.
- Solano-Gálvez, S. G., Tovar-Torres, S. M., Tron-Gómez, M. S., Weiser-Smeke, A. E., Álvarez-Hernández, D. A., Franyuti-Kelly, G. A., . . . Vázquez-López, R. (2018). Human dendritic cells: ontogeny and their subsets in health and disease. *Medical Sciences*, *6*(4), 88.
- Spiering, R., Margry, B., Keijzer, C., Petzold, C., Hoek, A., Wagenaar-Hilbers, J., . . . Broere, F. (2015). DEC205⁺ dendritic cell-targeted tolerogenic vaccination promotes immune tolerance in experimental autoimmune arthritis. *The Journal of Immunology*, *194*(10), 4804-4813.
- Stoitzner, P., Schaffenrath, S., Tripp, C. H., Reider, D., Komenda, K., Del Frari, B., . . . Romani, N. (2014). Human skin dendritic cells can be targeted in situ by intradermal injection of antibodies against lectin receptors. *Experimental dermatology*, *23*(12), 909-915.
- Subramaniam, S., Cao, D., Tian, D., Cao, Q. M., Overend, C., Yugo, D. M., . . . Catanzaro, N. (2017). Efficient priming of CD4 T cells by Langerin-expressing dendritic cells targeted with porcine epidemic diarrhea virus spike protein domains in pigs. *Virus research*, *227*, 212-219.
- Subramaniam, S., Piñeyro, P., Derscheid, R. J., Madson, D. M., Magstadt, D. R., & Meng, X.-J. (2017). Dendritic cell-targeted porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigens adjuvanted with polyinosinic-polycytidylic acid (poly (I: C)) induced non-

protective immune responses against heterologous type 2 PRRSV challenge in pigs. *Veterinary immunology and immunopathology*, 190, 18-25.

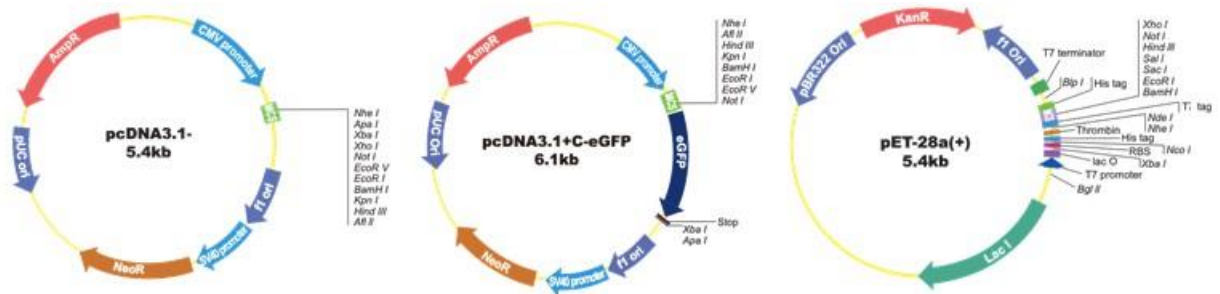
- Swiggard, W. J., Mirza, A., Nussenzweig, M. C., & Steinman, R. M. (1995). DEC-205, a 205-kDa protein abundant on mouse dendritic cells and thymic epithelium that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *Cellular immunology*, 165(2), 302-311.
- Talker, S. C., Baumann, A., Barut, G. T., Keller, I., Bruggmann, R., & Summerfield, A. (2018). Precise delineation and transcriptional characterization of bovine blood dendritic-cell and monocyte subsets. *Frontiers in immunology*, 9, 2505.
- Tel, J., Benitez-Ribas, D., Hoosemans, S., Cambi, A., Adema, G. J., Figdor, C. G., . . . de Vries, I. J. M. (2011). DEC-205 mediates antigen uptake and presentation by both resting and activated human plasmacytoid dendritic cells. *European journal of immunology*, 41(4), 1014-1023.
- Tischer, I., Gelderblom, H., Vettermann, W., & Koch, M. (1982). A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature*, 295(5844), 64-66.
- Tischer, I., Miels, W., Wolff, D., Vagt, M., & Griem, W. (1986). Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Archives of virology*, 91(3), 271-276.
- Tischer, I., Rasch, R., & Tochtermann, G. (1974). Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zenibl. Bukt.*, 226(2), 153-167.
- Tsuji, T., Matsuzaki, J., Kelly, M. P., Ramakrishna, V., Vitale, L., He, L.-Z., . . . Ritter, G. (2011). Antibody-targeted NY-ESO-1 to mannose receptor or DEC-205 in vitro elicits dual human CD8+ and CD4+ T cell responses with broad antigen specificity. *The Journal of Immunology*, 186(2), 1218-1227.
- Valladeau, J., Clair-Moninot, V., Dezutter-Dambuyant, C., Pin, J.-J., Kissenpfennig, A., Mattéi, M.-G., Koch, F. (2002). Identification of mouse langerin/CD207 in Langerhans cells and some dendritic cells of lymphoid tissues. *The Journal of Immunology*, 168(2), 782-792.
- van de Ven, R., van den Hout, M. F., Lindenberg, J. J., Sluijter, B. J., van Leeuwen, P. A., Loughheed, S. M., . . . de Gruijl, T. D. (2011). Characterization of four conventional dendritic cell subsets in human skin-draining lymph nodes in relation to T-cell activation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 118(9), 2502-2510.
- Villadangos, J. A., & Shortman, K. (2010). Found in translation: the human equivalent of mouse CD8+ dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*, 207(6), 1131.
- Volckmar, J., Gereke, M., Ebensen, T., Riese, P., Philipsen, L., Lienenklaus, S., . . . Müller, A. J. (2017). Targeted antigen delivery to dendritic cells elicits robust antiviral T cell-mediated immunity in the liver. *Scientific reports*, 7(1), 1-14.
- Xiao, C.-T., Harmon, K. M., Halbur, P. G., & Opriessnig, T. (2016). PCV2d-2 is the predominant type of PCV2 DNA in pig samples collected in the US during 2014–2016. *Veterinary microbiology*, 197, 72-77.
- Young, L. J., Wilson, N. S., Schnorrer, P., Proietto, A., Ten Broeke, T., Matsuki, Y., . . . Ohmura-Hoshino, M. (2008). Differential MHC class II synthesis and ubiquitination confers distinct antigen-presenting properties on conventional and plasmacytoid dendritic cells. *Nature*

immunology, 9(11), 1244-1252.

Zhang, H. H., Hu, W. Q., Li, J. Y., Liu, T. N., Zhou, J. Y., Opriessnig, T., & Xiao, C. T. (2020). Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as Porcine circovirus 4, Hunan province, China. *Transboundary and emerging diseases*, 67(3), 1057-1061.

Álvarez, B., Nieto-Peigrín, E., Martínez de la Riva, P., Toki, D., Poderoso, T., Revilla, C., . . . Domínguez, J. (2020). Characterization of the porcine CLEC12A and analysis of its expression on blood dendritic cell subsets. *Frontiers in immunology*, 11, 863.

10. APÉNDICES



Vectores de expresión utilizados para la producción de las proteínas recombinantes rAb ZH9F7-Cap, rAb ZH9F7-eGFP, rAbZH9F7-tCap, rAb 7DEU-tCap y tCap.