

**División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Posgrado en Biotecnología**

**“Clonación, expresión y evaluación antigénica de la proteína
recombinante N del SARS-CoV-2”**

TESIS

**Que para obtener el grado de
ESPECIALIZACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

QFB. Roxana Pastrana Unzueta

Matrícula: 2251800014

quimicaroxana@hotmail.com

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Gerardo Blancas Flores

JURADO

Asesor:

Dr. Gerardo Blancas Flores

Asesor:

Dr. José Luis Cerriteño Sánchez

Lector:

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Iztapalapa, Ciudad de México a 23 de marzo de 2026

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a mi madre Alicia Unzueta, por ser soporte, motivo de admiración y la razón del deseo de superarme cada día, sin ella esto no sería posible.

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a los investigadores que me brindaron su apoyo durante el posgrado de Especialización en Biotecnología. Su guía, conocimientos y generosidad fueron fundamentales para mi formación académica y para el desarrollo del presente trabajo. Gracias Dr. Gerardo Blancas Flores, Dr. José Luis Cerriteño Sánchez, Dra. Julieta Sandra Cuevas Romero, Dr. José Bryan García Cambrón, Dra. Dalia González Esparragoza, gracias a cada uno de ustedes por sus consejos, retroalimentación y acompañamiento durante el desarrollo de este trabajo, ya que sus aportaciones enriquecieron mi experiencia y me permitieron ampliar mis habilidades tanto en el ámbito científico como en el personal.

Al Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar por aceptar ser Sinodal y brindarme de su tiempo para la revisión del presente trabajo.

Reconozco con gratitud el tiempo y la dedicación que invirtieron en mi proceso, y espero que los frutos de este trabajo reflejen el compromiso y la excelencia que ustedes representan.

INDÍCE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
3. ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DEL GENOMA DEL CORONAVIRUS.....	3
3.1 Proteínas estructurales.....	4
3.2 Proteína N del SARS-CoV2.....	5
3.3 Respuesta inmunitaria.....	6
3.4 Ciclo replicativo del SARS CoV2.....	7
3.5 Proteínas recombinantes en SARS-CoV2.....	9
4. JUSTIFICACIÓN.....	10
5. HIPÓTESIS.....	11
6. OBJETIVOS.....	11
6.1 Objetivo general.....	11
6.2 Objetivos particulares.....	11
7. METODOLOGÍA.....	12
8. MATERIALES Y REACTIVOS.....	13
8.1 Amplificación mediante PCR del gen N.....	13
8.2 Purificación del gen N a partir de banda.....	14
8.3 Ligación al vector pJET.....	15
8.4 Preparación de células competentes.....	16
8.4.1 Transformación de células competentes.....	16
8.5 Extracción y análisis del DNA plasmídico.....	17
8.6 Ligación del gen N a pETSUMO	18
8.6.1 Análisis de plásmidos de expresión (pETSUMO-N-SARS CoV2)	18
8.7 Ensayos de expresión en células One Shot BL21/DE3.....	20
8.7.1 Producción de proteína y extracción de cuerpos de inclusión.....	21
8.8 Análisis de proteínas.....	22
9. RESULTADOS	24
9.1 Amplificación del gen N a partir de muestras de pacientes positivos.....	24
9.2 Clonación del gen N en el vector de resguardo pJET1.2	24
9.3 Subclonación del gen N al vector de expresión pETSUMO.....	26
9.4 Ensayos de expresión en células One Shot BL21/DE3.....	28

9.5 Extracción de cuerpos de inclusión	29
9.6 Análisis de secuenciación.....	31
10. ANÁLISIS DE RESULTADOS	32
11. CONCLUSIONES.....	34
12. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	35
13. BIBLIOGRAFÍA.....	36
14. ANEXOS.....	43

INDÍCE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura y organización genómica del SARS-CoV-2.....	3
Figura 2. Se representa la estructura del genoma del virus.....	4
Figura 3. Distribución estructural de los dominios del nucleocápside.....	5
Figura 4. Ciclo de replicación del SARS-CoV-2.....	8
Figura 5. Figura 5. Electroforesis del gen N.....	24
Figura 6. 6A. Testigo negativo. 6B. Testigo positivo. 6C. Muestra.....	25
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio de la amplificación de las muestras de los plásmidos obtenidos.....	25
Figura 8. Cultivo de colonias transformadas.....	26
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa extracción de plásmidos de ligación a pETSUMO.	26
Figura 10. Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de la correcta orientación de los genes clonados	27
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio de la amplificación de las muestras de plásmidos obtenidos, carril 1 marcador, carriles del 1 a las 7 muestras del 1 al 7.....	27
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio de la amplificación de muestras de los plásmidos obtenidos. Carril 1 Marcador, carril 2 y 4 muestra 5, carriles 3 y 5 muestra 6 de los plásmidos pETSUMO en fase con el gen N...28	28
Figura 13. Pruebas de expresión A. Testigo negativo. B Clonas de la cepa BL21-N de COVID-19.....	28
Figura 14. Pruebas de expresión de la cepa BL21-N de COVID-19. Arriba: gel SDS-PAGE teñido con azul de coomassie.	29
Figura 15. Expresión de la proteína N en <i>E. coli</i> . Western Blot con anticuerpos anti-his de las clonas inducidas con IPTG. Carril 1 Marcador, carril 2 Células completas, carril 3 fase sólida, carril 4 fase soluble, carril 5 cuerpos de inclusión.....	30
Figura 16. A. Electroforesis en gel de agarosa 0.7% teñido con bromuro de etidio. Carriles 2 y 3 se muestran los amplicones en el tamaño esperado. B. Mapa plásmidico del vector denominado pETSUMO-N SARS CoV2.....	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Primers diseñados.....	13
Tabla 2. Componentes de la reacción para amplificación de los ORFs.....	13
Tabla 3. Condiciones de la PCR para la amplificación de los ORFs de la proteína N....	14
Tabla 4. Mezcla de ligación a pJET.....	15
Tabla 5. Mezcla de ligación a pETSUMO.....	18
Tabla 6. Ensayos de tratamiento a cuerpos de inclusión.....	30

1. INTRODUCCIÓN

El síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV2) significó un antes y un después para el mundo, en el contexto económico, científico, sanitario y social, este virus responsable de la enfermedad de COVID-19, es infeccioso, altamente prevalente y potente, pertenece a la familia de los *Coronavirus* y es de origen zoonótico, detectado por primera vez en China con un diagnóstico de neumonía de origen desconocido, el COVID-19 se propagó rápidamente a nivel mundial con un estatus de emergencia sanitaria internacional. Para el 25 de noviembre de 2021, se habían registrado ya casi 257 millones de casos confirmados de COVID-19 en todo el mundo. Previo a este brote, se tenía conocimiento de algunos coronavirus que producían infecciones leves en humanos; sin embargo, tras la pandemia se evidenció su capacidad para provocar cuadros clínicos graves y potencialmente mortales.

Hasta ahora, el mundo sigue esforzándose por desarrollar nuevas formas de diagnosticar y tratar la enfermedad de COVID-19. A pesar del avance global que ha habido en el desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas para ésta enfermedad, todo se ha centrado predominantemente en la proteína espiga (Spike) del SARS-CoV2, no obstante, la aparición continua de variantes preocupantes ha evidenciado importantes limitaciones en las terapias dirigidas a dicha proteína.

Bajo este contexto, la proteína de la nucleocápside (proteína N) del SARS-CoV2 Se ha caracterizado como una proteína altamente conservada dentro de la familia de los coronavirus y en la evolución del virus, además, está implicada en el proceso clave de infección y ensamblaje viral. Es la proteína estructural viral más expresada tras la infección por SARS-CoV2 en humanos y tiene una alta inmunogenicidad. Por lo tanto, la proteína N es de interés para el desarrollo de herramientas biotecnológicas contra el virus y, puede tener una aplicación clínica con gran valor potencial de investigación.

Escherichia coli (*E. coli*) es uno de los sistemas de expresión más comunes para producir proteínas recombinantes. Esta bacteria ubicua ha sido un organismo modelo en la investigación científica por más de un siglo, uno de sus principales logros ha sido su uso como hospedador para la expresión de proteínas recombinantes, destacándose por su rápido crecimiento en medios simples y su capacidad para alcanzar altos niveles de producción, ofrece altos niveles de expresión, facilidad en la manipulación genética y rentabilidad (Lara, 2011).

El objetivo de este trabajo es desarrollar el primer sistema de expresión recombinante de la proteína N del virus de SARS-CoV2 producido en un sistema bacteriano, como candidato para el desarrollo de diversas herramientas biotecnológicas contra el virus.

2. MARCO TEÓRICO

Los coronavirus (CoV) se consideraban patógenos respiratorios relativamente inofensivos para los humanos. Sin embargo, hasta el momento se han identificado siete coronavirus capaces de infectar a los seres humanos, 229-E (α -CoV), NL63 (α -CoV), OC43 (β -CoV), HKU1 (β -CoV), MERS-CoV (β -CoV), SARS-CoV (β -CoV) y SARS-CoV2 (β -CoV) (García et al., 2020; Santos, 2021) dos de ellos provocaron brotes de infección grave del tracto respiratorio; en el 2002 el brote fue causado por el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) y en el 2012 se presentó el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV), ambos cruzando la barrera de las especies y presentaron altas tasas de patogenicidad y mortalidad en humanos (Song et al., 2019).

El brote de COVID-19, se presentó como una de las pandemias más catastróficas del siglo. El SARS-CoV2 fue identificado por primera vez en la ciudad de Wuhan (China), con una tasa de infecciones y muertos sin precedentes (Sofi et al., 2020), representando la crisis sanitaria más significativa del último siglo. Su propagación local y posterior expansión mundial alcanzaron rápidamente niveles alarmantes, afectando gravemente la salud pública y la economía global, lo que llevó a que fuera declarada una "Emergencia de Salud Pública de Importancia Internacional" en menos de un mes. Para el 2020, se había convertido en la tercera causa de mortalidad a nivel mundial y la segunda en el 2021, un periodo durante el cual se perdieron aproximadamente 13 millones de vidas, según los últimos reportes de la OMS (Escudero et al., 2020; WHO, 2024).

Esta pandemia, ha puesto de manifiesto la urgencia de contar con respuestas rápidas y adaptables en la industria para producir herramientas y reactivos necesarios para el diagnóstico, tratamiento y prevención de nuevas enfermedades virales de forma rentable (Machhi et al., 2020; Sofi et al., 2020).

3. ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DEL GENOMA DEL CORONAVIRUS

La partícula viral presenta proyecciones espiculares distribuidos a lo largo de su membrana, lo que le confiere la apariencia de una corona. Los coronavirus pertenecen al orden de los *Nidovirus* suborden *Cornidovirineae*, familia *Coronaviridae* y subfamilia *Orthocoronavirinae*, la cual se divide en 4 géneros: Alpha-coronavirus, Beta-coronavirus, Gamma-coronavirus y Delta-coronavirus, el SARS-CoV2 pertenece al género Beta-coronavirus, subgénero Sarbecovirus, dentro de la familia *Coronaviridae* y la subfamilia *Orthocoronaviridae*. (Liu et al., 2020) (V'kovski et al., 2021).

Los viriones de este virus son envueltos y esféricos, con un diámetro aproximado de 120-160 nm. Su genoma está compuesto por ARN monocatenario lineal de cadena sencilla en sentido positivo con un tamaño aproximado de 29,891 nucleótidos que codifica para 9,860 aminoácidos (García et al., 2020; Harrison et al., 2020; Hu et al., 2021). El genoma del SARS-CoV2 es el genoma más grande conocido de los virus de ARN, tiene una longitud de aproximadamente 26 Kb a 32 Kb de longitud, y contiene 14 marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican tanto proteínas estructurales como no estructurales (Fig. 1).



Figura 1. Estructura y organización genómica del SARS-CoV-2. Se esquematizan las proteínas estructurales S, M, E y N, que forman al SARS-CoV-2. Tomado de: Martínez-Anaya et al., 2020

Un primer segmento del genoma está formado por dos grandes regiones, ORF1a y ORF1b, que conforma aproximadamente dos tercios del ARN viral (Fig. 2). Estas regiones se escinden proteolíticamente para formar 16 proteínas no estructurales (nsp1-nsp16), las cuales desempeñan funciones clave, como la modulación de la respuesta inmune del huésped y la facilitación de la replicación del ARN viral. El segmento final del genoma codifica proteínas estructurales, entre ellas la proteína S (espícula), la M (membrana), la E (envoltura) y N (nucleocápside), así como otras proteínas accesorias (Yoshimoto, 2020; Gorkhali et al., 2021).

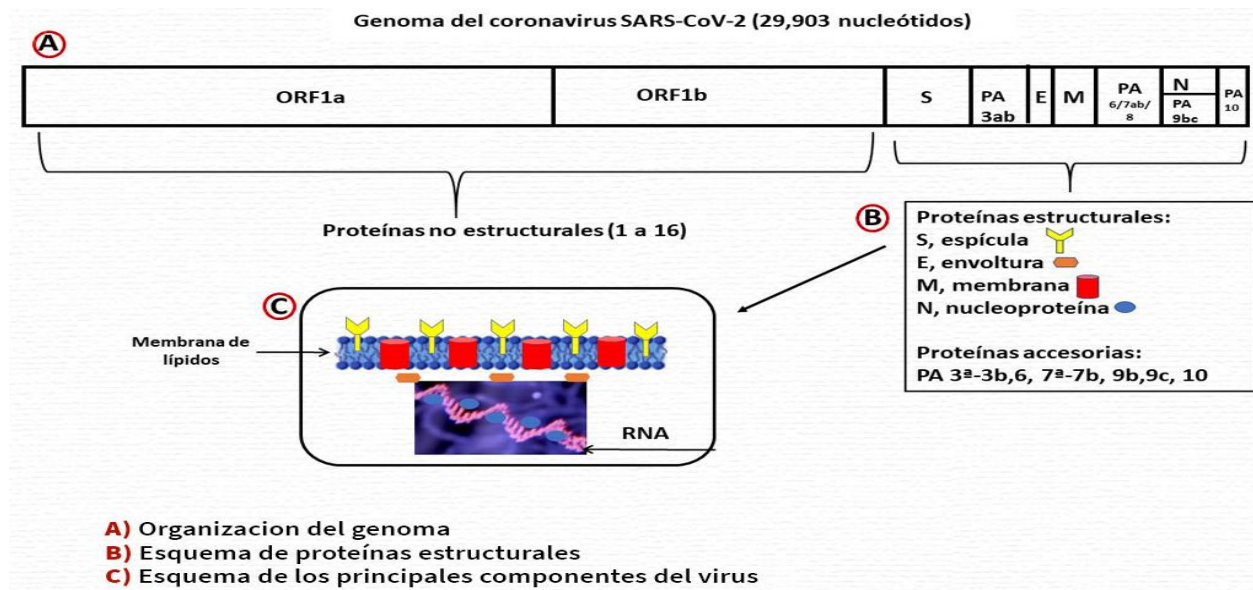


Figura 2. Se representa la estructura del genoma del virus. Imagen tomada de:
<https://ciencia.unam.mx/leer/1155/como-los-virus-impulsaron-el-desarrollo-de-las-ciencias-genomicas>

3.1 Proteínas estructurales

El grupo de las proteínas estructurales está formado por: **Membrana:** formada por 222 aminoácidos, esta proteína, interactúa con proteínas diferentes y consigo misma en interacciones que son cruciales para formar una partícula viral, la membrana coordina la incorporación de las demás proteínas estructurales (Zawilska et al., 2021). **Envoltura:** Esta proteína con tan solo 75 aminoácidos es la responsable de la virulencia de SARS CoV2, creando canales en la membrana de las células infectadas a través de los cuales el virión puede escapar e infectar más células. (Zawilska et al., 2021). **Espícula (Spike):** proteína de 1273 aminoácidos, distribuida radialmente sobre la membrana del virus, proyectándose hacia afuera, lo cual le da una característica de “corona solar”, formada por dos subunidades, S1 con dos dominios estructurales CTD (Dominio C-terminal) en donde también esa ubicada una subestructura específica que actúa directamente con ACE2 denominada dominio de unión al receptor (RBD), y NTD (Dominio N-terminal), desempeñando las principales funciones de reconocimiento y unión al receptor. Por otro lado, la subunidad S2, interactúa con una proteasa llamada proteasa transmembrana de serina 2 (TMPRSS2) que se encuentra en la membrana de las células del hospedero, siendo un factor imprescindible para la entrada del virus, ya que activa a la proteína Spike y permite la fusión viral entre las membranas virales y la del huésped (Zawilska et al., 2021).

3.2 Proteína N del SARS-CoV2

El análisis de la proteína N en el ciclo de replicación del SARS-CoV2, su papel en la patogénesis viral, sus efectos posteriores y su interacción con la respuesta inmunológica del huésped ha permitido una comprensión más profunda de sus funciones clave. Esta proteína, codificada por el noveno ORF del virus está formada por 419 aminoácidos (Zawilska, et al, 2021) y está formada por tres regiones IDR o intrínsecamente desordenadas que son N-terminal (brazo N), una región enlazadora flexible central (LKR) y C-Terminal (cola C). Por otro lado, cuenta con dos regiones estructuralmente conservadas el dominio N-terminal (NTD) y el dominio C-terminal (CTD), siendo este último imprescindible para darle estabilidad a la proteína (Fig. 3) (Bai et al., 2021; Huang et al., 2024).

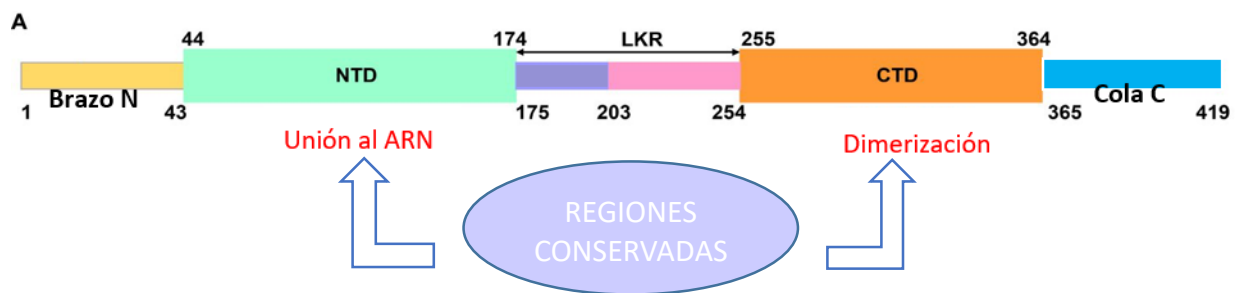


Figura 3. Distribución estructural de los dominios del nucleocápside. Modificado de: Huang et al., 2024.

Con base en la alineación de secuencias del SARS-CoV2 en comparación con otros CoV, se ha determinado que las estructuras de la proteína N (NTD y CTD) mantienen una alta conservación entre tres coronavirus beta altamente patógenos el SARS-CoV1, el MERS-CoV y el SARS-CoV-2. Asimismo, diversas zonas dentro de los CTD de las tres proteínas N comparten rasgos estructurales similares, lo cual indica que los dímeros de proteína N generados por el CTD cumplen una función esencial en la ensamblaje del complejo RNP y en la organización del genoma de ARN (Matsuo, 2021).

Siendo N una de las proteínas estructurales principales, su principal función es empaquetar el genoma viral y resulta imprescindible para el ciclo de vida, en el cual facilita la liberación del material genético viral mediante el proceso de disociación de la cápside y facilita el inicio del ensamblaje viral por las proteínas M y E (Huang et al., 2024). El sistema inmunológico innato constituye la primera línea de defensa ante infecciones de algún agente externo, este proceso facilita la eliminación de células infectadas y modula la respuesta inmunitaria del huésped en infecciones virales (Shibabaw et al., 2020).

Uno de los mecanismos contra estos agentes es la interferencia del ARN (ARNi) que es un proceso que promueve la degradación de los genomas virales y se encarga de inhibir la replicación (Zhang et al., 2020). No obstante, se ha demostrado que los virus suelen codificar proteínas que actúan como supresores para inhibir o evadir esta respuesta de ARNi. Estudios recientes hablan de que la proteína N mantiene una homología en sitios conservados y que le permiten actuar como supresor viral; esto la convierte en un factor clave en la evasión de las defensas inmunes del huésped (Huang et al., 2024). La nucleoproteína es altamente inmunogénica y durante la infección su producción es en grandes cantidades (Zawilska et al., 2021).

3.3 Respuesta inmunitaria

La respuesta inmunitaria frente al SARS-CoV-2 ha sido ampliamente estudiada, Mortari y colaboradores (2025) revisaron cómo las células T y B responden en distintos escenarios de inmunización contra la COVID-19; mencionan que una vez que el SARS CoV2 logra ingresar en el huésped, se desencadena una respuesta inmunitaria. Las principales células involucradas en la defensa de la enfermedad son las células T y las células B, siendo las primeras las responsables de promover una mayor concentración de citocinas proinflamatorias como IL6, TNF- α y el IFN- γ , que son liberadas por las células CD4. Las células CD8 promueven mayores cantidades de gránulos citotóxicos como perforina y granzima con el fin de destruir a las células infectadas. Por otro lado, las células B tienen la principal función de la neutralización, uniendo los anticuerpos neutralizantes al virus y bloqueando la infección al interferir en la interacción con los receptores ACE2, o bien, se unen a la cápside viral para cubrir las áreas de unión (Guo et al., 2024)

Sanz y colaboradores (2021) describieron cómo la defensa innata debería ser suficiente para erradicar la infección, siempre y cuando no se encuentre comprometida por otros factores, como lo son la edad, comorbilidades etc., ya que el daño en estos casos puede provocar síntomas graves. Por otro lado, cuando la respuesta inmunitaria controla la enfermedad, pero no es capaz de volver a la normalidad se provoca una sobre estimulación desencadenando las repuestas inflamatorias exacerbadas, conocida como tormenta de citocinas que agrava el panorama y puede ser fatal.

3.4 Ciclo replicativo del SARS-CoV2

El SARS-CoV2 ingresa principalmente a través del tracto respiratorio, no obstante, también infecta riñones, hígado, corazón cerebro y sangre. Es un virus que requiere de la maquinaria de la célula del huésped para poder realizar su ciclo viral, estos factores facilitan la infección. El genoma ARN monocatenario se encuentra encapsulado por la proteína N. Por otro lado, las proteínas estructurales que se encuentran dispuestas en la envoltura vírica son las que se encargan de asegurar la incorporación de la partícula viral durante el ensamblaje.

La entrada está mediada por la proteína Spike, que interactúa principalmente con los receptores celulares de las células diana, dicha proteína está compuesta por dos subunidades principales, S1 y S2 (Baggen et al., 2021; V'kovski et al., 2021). La S1 que tiene dos dominios estructurales, el dominio de unión al receptor (RBD) y el dominio N-terminal similar a la galectina (S-NTD), los cuales desempeñan un papel decisivo en el reconocimiento y la unión al receptor. La subunidad S2 contiene cinco dominios funcionales: un péptido de fusión (FP), regiones N- y C-terminal de repetición de heptadas (HR-N y HR-C), un dominio transmembrana (TM) y un dominio citoplasmático que promueve la fusión de membrana (Baggen et al., 2021; Zawilska et al., 2021).

El ciclo viral se puede sintetizar en cinco fases, unión, penetración, biosíntesis, maduración y liberación. Aunque se ha determinado que el enzima convertidora de angiotensina 2 ACE2 es el principal receptor involucrado en la unión con S1, se han identificado otros receptores como neuropilina-1 (NRP1) y Heparán sulfato (HS), que pueden ser capaces de favorecer la infección de forma independiente o servir como cofactores que potencian la infección a través de ACE2. La subunidad S1 es la encargada de la unión viral a una parte extracelular de ACE2. Esta interacción expone a la subunidad S2' la cual interactúa con las proteasas del huésped (como la serinproteasa de superficie celular TMPRSS2), que provocan la escisión proteolítica de los sitios S1 Y S2 de la proteína Spike, lo cual promueve cambios en su conformación y se libera el péptido de fusión que penetra en la membrana del huésped. Esto desencadena la fusión con la membrana plasmática, el ARN se libera en el citoplasma. La cadena de ARN (+) se replica en una cadena de ARN (-), misma que se utiliza para la replicación de otra cadena de ARN (+). Durante la replicación, el ARN genómico de cadena positiva no se transcribe de forma continua, sino por segmentos. Estos segmentos negativos actúan como copias intermedias, permitiendo luego la creación de nuevos ARN positivos que codifican proteínas estructurales y accesorias.

La traducción inmediata de dos grandes marcos de lectura abiertos, ORF1a y ORF1b produce dos poliproteínas, la poliproteína replicasa 1a (pp1a) y la poliproteína 1ab (pp1ab) (Zawilska et al., 202, Jackson et al., 2022). Las poliproteínas virales sufren un procesamiento autocatalítico que origina las proteínas estructurales nsp1-16, responsables de ensamblar el complejo RTC y reconfigurar las membranas celulares para el establecimiento de compartimientos de replicación (Baggen et al., 2021; V'kovski et al., 2021).

El tercio restante del genoma, en el extremo 3', contiene ORFs solapados que codifican cuatro proteínas estructurales principales espiga (S), membrana (M), envoltura (E) y nucleocápside (N), así como varias proteínas accesorias, incluyendo ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9 y ORF10 y que se ensamblan en el ERGIC, en el que se forman nuevos viriones por gemación en el lumen. Finalmente, los viriones son secretados de la célula infectada por exocitosis (Baggen et al., 2021; Zawilska et al., 2021) (Fig.4).

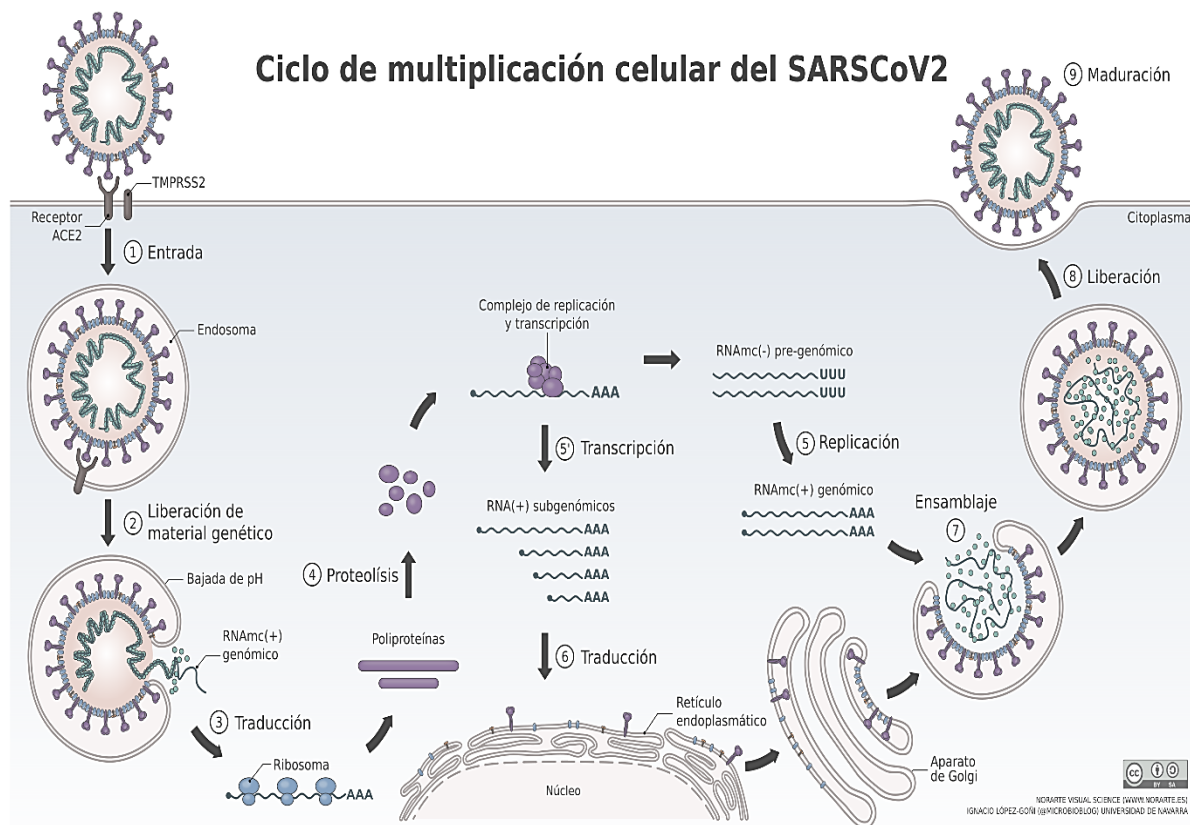


Figura 4. Ciclo de replicación del SARS-CoV-2. Tomada de https://culturacientifica.com/app/uploads/2021/05/SARS-CoV-2_ciclo.png

3.5 Proteínas recombinantes en SARS-CoV2

La producción de proteínas recombinantes constituye una herramienta fundamental en la biología molecular, biotecnología y la medicina, ya que permite obtener y disponer de moléculas o parte de ellas en cantidades suficientes para utilizarla en el diagnóstico y de forma terapéutica. En el caso de SARS CoV2, el desarrollo de estas proteínas ha sido esencial para la investigación y el desarrollo de vacunas. La creación de proteínas recombinantes de los componentes estructurales del SARS-CoV2 ha permitido desarrollar plataformas de vacunas basadas en subunidades antigénicas, las cuales inducen respuestas inmunes sin la necesidad de utilizar el virus completo.

Este enfoque ha sido clave para el diseño de modelos vacunales, como los que se han administrado a nivel global para combatir el COVID-19 (Peng et al., 2021; Zang et al., 2021; de Pinho et al., 2022). El diseño, producción y desarrollo de proteínas sintéticas han demostrado ser herramientas de suma importancia en la lucha contra el SARS-CoV2 y otros patógenos. Esta tecnología ha permitido avances rápidos en la creación de diagnósticos, terapias y vacunas, proporcionando recursos clave para el control de brotes de diferentes enfermedades (Robson, 2020; Almeshdi et al., 2021).

En estudios anteriores, se ha trabajado con la proteína recombinante N, tanto en su fase soluble como en la replegada, desarrollando metodologías de purificación tomando estas dos formas para realizar estudios bioquímicos y desarrollar ensayos serológicos para implementar una posible herramienta diagnóstica en sueros de gatos (Di et al., 2021).

Tarczewska y colaboradores (2022) abordaron el tema de la complejidad en cuanto a la estructura y la función de la nucleoproteína. También se ha trabajado en estudios previos con los diferentes métodos de purificación con el fin de obtener una solución de la proteína N sin presencia de los ácidos nucleicos, con el fin de comparar las propiedades moleculares de esa solución en comparación con las resultantes de los métodos comunes y verificar el impacto de la presencia de los ácidos nucleicos en los resultados de los ensayos bioquímicos.

Dentro de la búsqueda de alternativas para proteger inmunológicamente a los pacientes se han publicado también trabajos que proponen biológicos vacunales basados en la nucleoproteína. Min Thura y colaboradores (2021) propusieron que las proteínas de nucleocápside (N) conservadas intra-virales pueden ser blanco de nuevas vacunas contra los SARS-CoV.

4. JUSTIFICACIÓN

Es fundamental desarrollar herramientas basadas en proteínas recombinantes que contribuyan en el tratamiento, control y seguimiento del SARS-CoV2, especialmente en casos asintomáticos que pasan desapercibidos, o pacientes de alto riesgo que, debido a una detección tardía, retrasan su atención médica, factores que pueden desempeñar un papel importante en la propagación del virus en un futuro.

Actualmente, se ha reportado una gran cantidad de mutaciones, principalmente en el gen que codifica la proteína S del SARS-CoV2, lo cual ha dado lugar a diversas variantes de este virus. Sin embargo, el análisis comparativo de las secuencias de diferentes aislados del virus muestra que la secuencia codificante para la proteína N no presenta variaciones significativas, y dada su importancia en la replicación e infección del SARS-CoV2 y debido a su baja tasa de mutación, puede servir como un objetivo eficaz para el desarrollo de pruebas serológicas que permitan diferenciar entre personas vacunadas y aquellas infectadas, como herramientas de diagnóstico que aporten información sobre la longevidad de los anticuerpos contra el SARS-CoV2 o bien, para el desarrollo de biológicos que puedan proteger al organismo. Esto permitiría una detección temprana, más precisa y confiable, facilitando un seguimiento adecuado del estado inmunológico de la población. Adicionalmente, se han identificado múltiples regiones antigénicas en la nucleoproteína N, con potencial para producir anticuerpos, lo que respalda su uso en el desarrollo de biológicos inmunogénicos. Por lo tanto, el desarrollo de la proteína recombinante (N) del SARS-CoV2 permitirá generar datos fundamentales para respaldar el desarrollo y aplicación de herramientas diagnósticas confiables, por lo que su uso en el desarrollo de un sistema diagnóstico en respuesta a la evolución continua de las variantes del SARS-CoV2 es una opción altamente atractiva.

5. HIPÓTESIS

La expresión recombinante de la proteína de la nucleocápside del SARS-CoV-2 en *Escherichia coli* permitirá obtener un antígeno inmunológicamente funcional. Esto facilitará el desarrollo de pruebas serológicas accesibles y confiables, contribuyendo al diagnóstico y vigilancia epidemiológica de la COVID-19.

6. OBJETIVOS

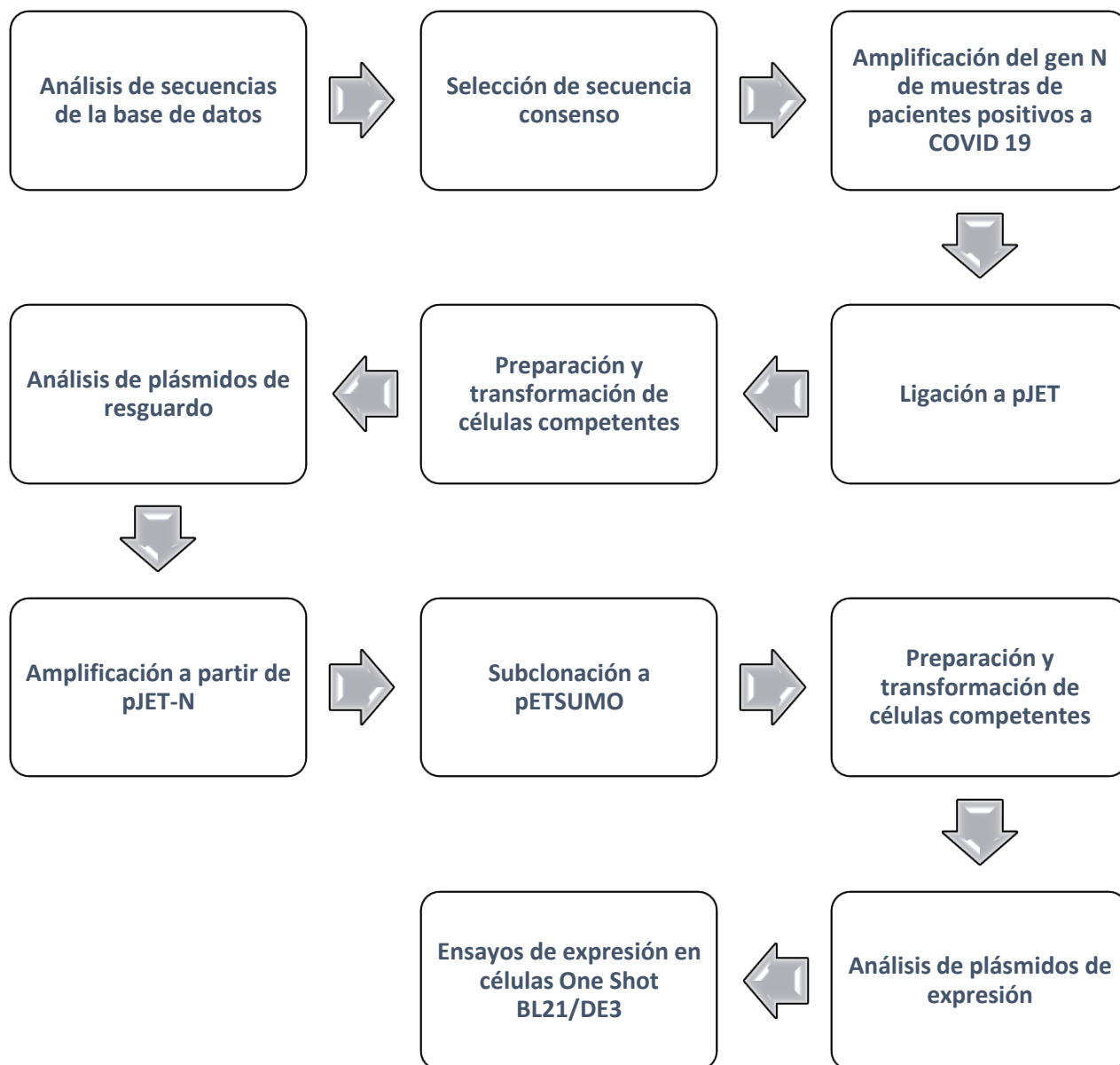
6.1 Objetivo general

- Obtener un sistema de expresión recombinante de la nucleoproteína (N) del SARS-CoV2 mediante la producción en el sistema de expresión procarionte *Escherichia coli*, con el fin de obtener un antígeno accesible que pueda emplearse en el desarrollo de herramientas diagnósticas serológicas, estudios de inmunogenicidad y aplicaciones en investigación.

6.2 Objetivos particulares

- Amplificar y clonar el gen de la nucleoproteína N del SARS-CoV2 a partir de RNA viral extraído de una muestra de un paciente positivo.
- Construir un sistema de expresión recombinante mediante la clonación del gen N en el vector pET-SUMO para su producción en *E. coli*.
- Evaluar la expresión de la proteína recombinante N en *E. coli* mediante su inducción con IPTG.

7. METODOLOGÍA



8. MATERIALES Y REACTIVOS

Las muestras de cDNA correspondiente a una muestra de un paciente positivo a COVID-19 obtenida en 2020, fue proporcionada por el laboratorio de Química de la UNAM. Los plásmidos fueron donados para desarrollar este proyecto, se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar la región proteica apropiada a partir de muestras de pacientes en el laboratorio de Epizootiología del CENID-SAI. A partir de la secuencia consenso se diseñó el par de primers los cuales se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Primers diseñados

PRIMER'S		pb	GC%	Tm	DG
FW	5' ATGTCTGATAATGGACCCCAAATC '3	25	40	55.2	-45.31.24
RV	5' TTAGGCCTGAGTTGAGTCAG '3	20	50	53.9	-35.39

*pb: pares de bases, GC%: porcentaje de Guaninas y Citocinas, Tm: Temperatura media, DG delta G.

8.1 Amplificación mediante PCR del gen N

Con el objetivo de amplificar el gen N de SARS-CoV2, el ORF (marco de lectura abierto) de la proteína fue amplificado mediante PCR punto final, utilizando los pares de primers mencionados anteriormente. La mezcla de reacción se muestra en la Tabla 2. Posteriormente, las temperaturas del programa en el termociclador se muestran en la Tabla 3 y finalmente, los productos se analizaron en electroforesis en gel de agarosa al 1% durante 35 min a 100 V, revelados con luz UV.

Tabla 2. Componentes de la reacción para amplificación de los ORFs

Componentes	Concentración	Cantidad añadida (µl)
Buffer	1X	5
dNTP	0.2 µM	1
Oligonucleótido delantero	0.5 µM	5
Oligonucleótido reverso	0.5 µM	5
MgCl₂	2 mM	5
Muestra	500 ng	1 µl (por muestra)
Taq polimerasa	1.25 U/L	0.25
H₂O	----	23.75
TOTAL		50 µl

Tabla 3. Condiciones de la PCR para la amplificación de los ORFs de la proteína N

Etapa	T (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95	2 min	1
Desnaturalización inicial	95	30 s	30
Alineamiento	54.4		
Extensión	72		
Extensión final	72	1. min	1

8.2 Purificación del gen N a partir de banda

Una vez visualizado la correcta amplificación del gen N (1260 pb), se procedió a purificarlo a partir de banda del gel de agarosa. Para esto, se cortó la banda de interés con un bisturí nuevo, se transfirieron aproximadamente 300 mg del corte de gel a un tubo Eppendorf. Posteriormente se utilizó el Kit comercial kit FAVORGEN BIOTECH CORP FavorPrep™ GEL/PCR Purification kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se añadieron 500 µl de tampón FADF a la muestra. Se realizó una incubación a 55 °C durante 5-10 min, agitando el tubo cada 2-3 min para lograr que la porción de gel se disolviera por completo. Una vez disuelto se enfrió a temperatura ambiente y se colocó una columna FADF en un tubo de recolección. Se transfirieron 800 µl de la mezcla de muestra a la columna FADF y se centrifugó a 11000 x g durante 30 seg, descartando el líquido sobrante. Se añadieron 750 µl de tampón de lavado a la columna FADF y se centrifugó a 11000 x g durante 30 seg y se desechó el líquido sobrante. Se volvió a centrifugar a máxima velocidad (~18000 x g) durante 3 min más para secar la matriz de la columna y posteriormente se colocó la columna FADF en un nuevo tubo Eppendorf, después de colocarlo se añadieron 40 µl de tampón de elución al centro de la membrana de la columna FADF y se dejó reposar la columna FADF durante 1 min; se realizó una última centrifugación a máxima velocidad durante 2 min con el fin de obtener todo el producto de la membrana.

8.3 Ligación al vector pJET

El vector pJET es un plásmido utilizado para clonar fragmentos de ADN de nuestro interés. En este caso, el gen de la proteína N del SARS CoV2, convirtiéndose en una herramienta muy útil en la clonación. Este vector tiene varias características importantes: está formado por una región llamada MCS (Sitio de Clonación Múltiple) que contiene varios sitios de restricción facilitando la unión a los extremos como de los productos de PCR. Además, cuenta con una enzima de restricción letal llamada *eco47IR*, misma que es interrumpida cuando el fragmento de PCR se inserta correctamente en el sitio de clonación, de lo contrario, esta enzima se expresa y mata la bacteria, lo que asegura que solo las células bacterianas con plásmidos recombinantes pueden formar colonias, es decir, solo los clones con inserto sobrevivan. Un promotor T7 que facilita T7 que facilita la transcripción in vitro e in vivo del ADN insertado. Contiene un gen que le confiere resistencia a la ampicilina, permite una clonación rápida, con más del 95% de clones positivos.

Para resguardar el gen N, se procedió a ligarlo a un vector de resguardo.

El gen N purificado de gel, se utilizó para llevar a cabo el proceso de ligación en el plásmido mediante el *Kit de clonación PCR CloneJET*. Las cantidades para la mezcla de ligación se muestran en la Tabla 4 y una vez realizada la mezcla de ligación, se incubó a temperatura ambiente por 16 h.

Tabla 4. Mezcla de ligación a pJET

Reactivo	Cantidad
Buffer 2x	10µl
Inserto	7µl
Blunting	1µl
Incubación 70°C 5 min	
Choque en hielo 2 min	
pJet	1µl
Ligasa	1µl
TOTAL	20µl

8.4 Preparación de células competentes

Para poder introducir los plásmidos obtenidos en *E. coli*, se realizó la preparación de células competentes One Shot™ TOP10, es derivada de la línea k-12 y son de gran utilidad para la replicación estable de plásmidos y en un alto número de copias. Principalmente se emplean para la clonación y mantenimiento de plásmidos, es por ello que es un hospedero ideal para la propagación de vectores como pJET y se considera un vector de resguardo.

Para esto, 10 ml de medio LB (Luria Bertani) se inocularon con la cepa de *E. coli* One Shot™ TOP10 y se llevó a crecimiento por 16 h a una temperatura de 37°C a 220 rpm. Esto corresponde a un precultivo. Posteriormente, 50 ml de medio LB fueron inoculados con 20 µl del precultivo, se llevó a crecimiento a 37°C, 220 rpm y se monitoreó el crecimiento mediante absorbancia a 600 nm, hasta que el cultivo alcanzó 0.35 de absorbancia. Una vez que el cultivo alcanzó el crecimiento se transfirió el caldo a un tubo de 50 ml estéril y se colocó en hielo por 10 min, se centrifugó a 4100 rpm por 10 min a 4°C eliminando el sobrenadante, y el pellet se resuspendió en 15 ml de MgCl₂-CaCl₂ (80 mmol MgCl₂, 20 mmol CaCl₂) a 4°C, después, se centrifugó a 4100 rpm por 10 min 4° C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de la solución 0.1 M de CaCl₂ a 4°C. Las células se mantuvieron en hielo para la transformación.

8.4.1 Transformación de células competentes

Para transformar directamente las células tratadas con cloruro de calcio, se transfirieron 200 µl de cada suspensión de células competentes a 4 tubos Eppendorf de 1.5 ml y se añadieron 10 µl del ADN a cada tubo homogenizando la mezcla suavemente. El choque térmico consistió en conservar durante 30 min los tubos en hielo, luego se transfirieron 90 seg exactos a un baño de agua de 42°C y posteriormente a hielo de nuevo durante 1min. El choque térmico es un paso crucial, para que las células alcancen la temperatura exacta en los tiempos establecidos.

Se adicionaron 800 µl de medio LB a cada tubo (+, -, muestra) y se colocó en incubación a 37°C durante 45 min para dejar crecer el cultivo. Posterior a la incubación se colocaron 200 µl en cada placa Petri con su respectivo marcador de selección para realizar el sembrado de cada una de las muestras y se dejaron en crecimiento a 37°C por 16 h. Después de la incubación se observó el crecimiento de colonias, se seleccionaron algunas de ellas y se propagaron en medio LB+antibiótico para la extracción de plásmidos o pruebas de expresión. También se llevaron a cabo permanentes de glicerol para resguardar las cepas en congelación a -70°C.

8.5 Extracción y análisis del ADN plasmídico

Se realizó la purificación de la muestra mediante el kit FAVORGEN BIOTECH CORP FavorPrep™ GEL/PCR Purification kit, siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente: Se transfirió un volumen de 1 a 3 ml de cultivo bacteriano a un tubo Eppendorf, se centrifugó 11000 x g durante 1 min para sedimentar las células y el sobrenadante se descartó. Posteriormente se resuspendió en 1 ml de agua destilada y se volvió a clarificar mediante centrifugación, se añadieron 200 µl de tampón FAPD1 y se homogenizó para resuspender las células hasta desaparecer por completo la pastilla, se añadieron 200 µl de tampón FAPD2 homogenizando suavemente el tubo de 5 a 10 veces y se incubó a temperatura ambiente durante 2 a 5 min para lisar las células, hasta que la muestra se volvió transparente. Después se añadieron 300 µl de tampón FAPD3 y se volvió a homogenizar mediante inversiones de 5 a 10 veces con el fin de neutralizar el lisado, la muestra se centrifugó a máxima velocidad (~18000 x g) durante 5 min para clarificar el lisado. Se colocó una columna FAPD en un tubo de recolección, la muestra se transfirió a la columna y se centrifugó 11000 x g durante 30 seg, el sobrante recolectado en el tubo de recolección se descartó, y se tomó el sobrenadante con una micropipeta sin tocar la pastilla con la punta, después se añadieron 400 µl de tampón W1 a la columna FAPD y se sometió a centrifugación durante 30 seg a 11000 x g. Se descartó el volumen recolectado en el tubo de recolección y se colocó de nuevo la columna, se añadieron 700 µl de solución de lavado y se centrifugó a 11 000 x g durante 30 seg, después se volvió a centrifugar a máxima velocidad (~18 000 x g) durante 3 min más para eliminar todo el líquido residual de la columna FAPD y se colocó en un nuevo tubo Eppendorf, se añadieron 50 µl de tampón de elución en la membrana de la columna FAPD y se dejó reposar durante 1 min. Posteriormente se realizó otra centrifugación a máxima velocidad (~18 000 x g) durante 1 min para eluir el ADN plasmídico

Este kit permite la recuperación eficiente de fragmentos de ADN (entre 100 pb y 10 kb) a partir de geles de agarosa, PCR u otras reacciones enzimáticas. Posteriormente, los fragmentos purificados de ADN se utilizaron para la ligación con el vector pJET. Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa para determinar la presencia de dicho inserto, esto con el fin de elegir el plásmido que tuviera el peso esperado (1260 pb).

8.6 Ligación del gen N a pETSUMO

Como parte de la estrategia de expresión recombinante se utilizó el sistema de expresión Champion™ pETSUMO. Para llevar a cabo una correcta ligación al vector de expresión, se amplificó el gen N a partir de pJET-N colocando 30 min en la extensión final del protocolo de amplificación en el termociclador, con el fin de que la Taq polimerasa añadiera las A' libres en los extremos del producto de PCR, ya que el sistema de pETSUMO se liga mediante los extremos T' libres del vector. La purificación del producto de la PCR se realizó a temperatura ambiente para evitar la degradación de la cola de adenina y posteriormente se llevó a cabo la subclonación en el vector Champion™ pETSUMO mediante la reacción de ligación descrita en la tabla 5.

Tabla 5. Mezcla de ligación a pETSUMO

Reactivo	Cantidad
Buffer 10x	1μl
Inserto (1:5)	2μl
pETSUMO	2μl
Agua	4μl
Ligasa	1μl
TOTAL	10μl

Una vez concluida la ligación se realizó de nuevo el protocolo de transformación con la cepa de Top10 para resguardo y análisis de plásmidos y la cepa BL21(DE3) para expresión de la proteína. Estas cepas fueron denominadas BL21-N-SARS-CoV2.

8.6.1 Análisis de los plásmidos de expresión (pETSUMO-N-SARS-CoV2)

El vector pETSUMO es una herramienta de clonación y expresión utilizada en biología molecular para producir proteínas recombinantes en *E coli*. Entre las características más significativas de este sistema se encuentran: Etiqueta o modificador similar a la ubiquitina SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier), la cual es miembro de una familia de proteínas similares a la ubiquitina, que regula varios procesos celulares como son apoptosis, transporte nuclear etc.

Sin embargo, esta etiqueta SUMO tiene una modificación que conduce a un aumento en los niveles de expresión y coadyuva para lograr una mayor solubilidad de la proteína resultante. Las fusiones de SUMO pueden aumentar la expresión de proteínas recombinantes y mejorar la solubilidad de proteínas que, de otro modo, serían parcialmente insolubles (Peciak et al., 2014). Por otro lado, esta etiqueta también es reconocida por una proteasa SUMO que corta específicamente la etiqueta y esto da lugar a una generación de proteínas nativas en *E coli* sin aminoácidos adicionales añadidos en el sitio de escisión.

El promotor T7lac, que permite la expresión inducible mediante IPTG; el gen lacI, que codifica la proteína represor Lac, la cual se une a los operadores lac en ambos sitios, tanto en el T7lac del plásmido como al sitio lacUV5 del cromosoma, bloqueando la transcripción basal hasta el momento en el que se añada el IPTG el cual libera éstos operadores permitiendo un control sobre la producción de la proteína y así evitar la acumulación de proteínas tóxicas y producción descontrolada. Este vector también utiliza la alta especificidad y actividad de la ARN polimerasa del bacteriófago T7 para permitir la expresión regulada de genes a partir del promotor T7, fácil eliminación de la proteína de fusión SUMO por medio de la cromatografía de afinidad en una resina quelante de níquel. Posee una etiqueta de poli-histidina N-terminal que resulta útil para purificar las proteínas recombinantes obtenidas mediante cromatografía de afinidad. Contiene un gen que le confiere resistencia a la kanamicina lo cual permite que sea un método selectivo; el origen pBR322 coadyuva en la replicación y el mantenimiento de baja copia en *E coli*. lo cual asegura la replicación estable del plásmido, y esto reduce la carga metabólica sobre la célula hospedera reduciendo el estrés y favoreciendo la estabilidad del inserto. Todas estas características únicas lo hacen muy eficiente (Fig. 6).

Una vez obtenidas las colonias transformadas con el plásmido de expresión, se realizó una PCR para analizar la correcta orientación del inserto N dentro de los plásmidos obtenidos y corroborar que quedaran en fase con el vector de expresión para producir la proteína recombinante. Para ello, el tamaño de amplicón aumentará en aproximadamente 100 pb más (1360 pb), ya que, se utilizó el oligonucleótido delantero Fw-SUMO que se hibrida en una región del vector de expresión, en el caso del oligonucleótido reverso fue el mismo que se empleó anteriormente que se hibrida en el gen N (Rev-N). En el programa del termociclador se colocó en la fase de extensión un tiempo de 1.30 min ya que el producto debe ser mayor, esperando un aproximado de 1360 pb. Posteriormente se mandó a secuenciar mediante SANGER en el IBT de Cuernavaca para corroborar el resultado obtenido usando los oligos delantero Fw-SUMO y el Rev-SUMO.

8.7 Ensayos de expresión en células One Shot BL21 (DE3)

La cepa *E. coli* BL21 DE3 ha sido el estándar de referencia para la expresión de proteínas ya que promueven un alto rendimiento, facilidad de uso y son compatibles con potentes sistemas de expresión. En cuanto a las cepas de expresión, se han empleado desde 1990. Las cepas T7 son lisógenos del bacteriófago DE3. Se trata de una cepa de *E. coli* que contiene en su cromosoma, un gen de la ARN polimerasa T7, bajo el control del promotor lacUV5, esta configuración permite una expresión potente, inducible por IPTG. a su vez, también carece de las proteasas Lon y OmpT. La ausencia de estas proteasas le confiere la capacidad de reducir la degradación de las proteínas heterólogas durante y después de la expresión, lo que permite además de la expresión obtener un rendimiento mayor. Sin embargo, debido a la potente naturaleza del sistema promotor T7, las proteínas pueden acumularse rápidamente y dar lugar a la formación de cuerpos de inclusión.

En la fase correspondiente a la expresión en células, se utilizó la cepa de expresión One Shot BL21 (DE3). Al verificar que los plásmidos se encontraron en orientación, se procedió a realizar la transformación de células competentes en la cepa BL21 DE3, en medio LB y antibiótico kanamicina mediante choque térmico. Se realizó el sembrado de las muestras y se dejaron en crecimiento a 37°C por 16 h. Después de la incubación se observó el crecimiento de colonias y una vez que se obtuvieron las colonias transformadas se seleccionaron 10 de ellas para realizar las pruebas de expresión, finalmente las cepas de expresión fueron denominadas BL21-N-SARS-CoV2.

Se tomaron las cepas transformadas BL21-N-SARS-CoV2 y se transfirió cada una a 10 ml de medio líquido LB adicionado con 50 µl de antibiótico (Kanamicina), este precultivo se dejó en agitación a 250 rpm y con una temperatura 37°C durante 16 h. Una vez pasado este tiempo se tomó una alícuota, se realizó una dilución 1:10 de la muestra para determinar la densidad óptica a 600nm en un espectrofotómetro. Una vez obtenido el valor de absorbancia, se utilizó la fórmula $C_1V_1=C_2V_2$ para comenzar un nuevo cultivo de expresión a 0.1 UA.

Este nuevo cultivo se colocó en incubación en un agitador industrial a una temperatura de 37°C, durante aproximadamente una hora, o hasta alcanzar una absorbancia de DO 0.5 UA. Al obtener esta absorbancia, se colocaron 30 µl de IPTG al cultivo con el fin de inducir su crecimiento hasta obtener una concentración final de 1.5 M en el medio y se dejó en crecimiento en agitación constante a una temperatura de 37°C. durante toda la noche.

Finalmente, al terminar la expresión, se tomó la absorbancia de cada muestra diluida 1:10, se realizó un cálculo para ajustar a 0.6 UA, se colectaron en tubos Eppendorf, se clarificó mediante centrifugación, se eliminó el sobrenadante, y el paquete celular se resuspendió en buffer reductor 4x, estas muestras se colocaron en un baño maría hirviendo durante 10 min. Para determinar la presencia de las proteínas recombinantes se llevaron a cabo geles SDS PAGE teñidos con Coomassie y western blot en los que se cargaron 5 µl y 10 µl de muestra, respectivamente. Para el western blot, se emplearon anticuerpos anti-His con el objetivo de identificar la muestra candidata más prometedora para futuros ensayos de expresión a mayor escala.

8.7.1 Producción de proteína y extracción de cuerpos de inclusión

Una vez que se seleccionó la cepa de expresión BL21-N-SARS-CoV2, se realizó un precultivo como se mencionó anteriormente el cual que se dejó en agitación a 250 rpm y con una temperatura 37°C durante 16 h, pasado este tiempo de nuevo se tomó la absorbancia de la muestra diluida 1:10 para ajustar a 0.1 y realizar la inoculación de la muestra en 100 ml de medio LB. Cuando la absorbancia llegó a 0.5 UA, se indujo con 300 µl de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y se dejó en incubación a 250 rpm y con una temperatura 37°C durante 16 h.

Después de la inducción de expresión, se tomó una alícuota del paquete celular y se colocó en congelación para su posterior análisis (alícuota de células completas); El resto de las células se recuperaron mediante centrifugación a 8000 rpm por 25 min y el pellet celular se lavó con 20 ml de agua destilada, ésta solución se clarificó nuevamente mediante centrifugación 8000 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante, y el pellet se resuspendió en 500 ml de una solución amortiguadora de TRIS-HCl 5 mmol pH 7.5 se dejó en agitación durante 10 min.

Esta solución fue sometida a tratamiento con alta presión (7000PSI) con ayuda de un homogenizador industrial Gaulin, en el cual la muestra recirculó durante 15 min provocando el rompimiento celular, pasado este tiempo se tomó una alícuota de 200 µl del sobrenadante para su posterior análisis (alícuota de la fase de rompimiento). Después de retirar la muestra del homogeneizador, se sometió a dos ciclos de centrifugación a 8000 rpm a 4°C durante 20 min, posterior a la centrifugación se tomó otra alícuota del sobrenadante (fase soluble) y se recolectó el pellet (los cuerpos de inclusión). Una sobreexpresión del gen heterólogo puede inducir la formación de cuerpos de inclusión, es decir, agregados proteínicos intracelulares.

Aunque estos cuerpos pueden facilitar el proceso de purificación de la proteína recombinante (PR), también implican etapas adicionales durante la purificación. Además, es necesario implementar estrategias para recuperar el correcto plegamiento de la PR antes de su incorporación al producto final (Lara Álvaro, 2011). Posteriormente, el pellet (en el cual se encontraban los cuerpos de inclusión) se colocó en 50 ml de un buffer de solubilización (SDS, betamercaptoetanol, Tris-HCl 1 M, aforado a 50 ml) para ayudar a desagregar las proteínas recombinantes mal plegadas y la solución se quedó en agitación durante 24 h a temperatura ambiente.

Para el procedimiento de separación de moléculas mediante diálisis se utilizó una membrana, la cual se hidrató en agua destilada hirviendo durante 3 min, sellándola de un extremo y en la cual posteriormente se colocó la solución proteínica para después sellarla por completo mediante prensas especiales. Dicha membrana se sumergió en una solución de Tris-HCl 50 mmol y se dejó dializar mediante una agitación suave con el fin de eliminar el betamercaptoetanol y el SDS. Se realizaron cambios de solución de diálisis cada 3 h hasta completar un mínimo de 500 volúmenes. Al finalizar la diálisis, se midió el volumen final de la muestra y se colocó en un buffer de unión para la columna (sarcosyl al 7%, Tris-HCl 50 mmol pH8) para preparar la muestra para purificación.

8.8 Análisis de proteínas

La electroforesis es una técnica fundamental para el análisis de proteínas mediante su separación, identificación y caracterización de proteínas mediante su tamaño y carga eléctrica. Esta técnica fue utilizada para examinar las muestras recolectadas a lo largo del proceso de la producción de la proteína (las células completas, la fase sólida, la fase soluble y los cuerpos de inclusión) con el fin de determinar en cuál de las fases es donde se encuentra la mayor cantidad de proteína recombinante, para este fin, se tomó una alícuota de 75 µl de cada una de las muestras y se mezclaron con 25 µl de buffer 4X, se colocaron en agua que se encontraba en ebullición durante 10 min. Posteriormente se colocaron en los pocillos de un gel de poliacrilamida al 12% con un separador de 1.0 mm. La electroforesis se realizó a 70 volts en la fracción del gel concentrador y una vez que las muestras ingresaron al gel de corrida se cambió el voltaje a 100 volts y se mantuvo así durante el resto del corrimiento.

Al término de la electroforesis se realizó la tinción de Coomassie, la cual es de gran utilidad para visualizar las proteínas contenidas en el gel de poliacrilamida, formando un complejo proteína-tinción que resulta en un color azul intenso tras una incubación del gel en una solución de teñido (0.05% Azul de Coomassie, en 50 % etanol y 10 % ácido acético en 100 ml) por 1 h con agitación suave. Posteriormente el gel se colocó en una solución de destañido que contiene lo mismo que la anterior, pero sin el reactivo Coomassie durante 5 min. Las proteínas presentes se evidenciaron en el gel en forma de bandas azules intensas que nos indicaron el tamaño de nuestra proteína con respecto al marcador de peso. Lo cual se muestra en nuestros resultados más adelante. Por otro lado, para realizar un análisis por western blot, se llevó a cabo la transferencia húmeda de las proteínas contenidas en el segundo gel a la membrana de PVDF. Se colocaron todos los elementos (dos porciones de papel filtro, el gel de poliacrilamida con las proteínas de interés, la membrana, y dos porciones de papel filtro más, los cuales fueron humedecidos con buffer de transferencia y posteriormente se colocaron en el equipo programado a 24 volts.

Para confirmar la expresión de las proteínas, posterior a la transferencia, la membrana de PVDF se bloqueó con una solución de leche descremada al 5% en PBS durante una hora a temperatura ambiente, y después de realizar lavados con PBS-Tween al 0.5% se colocó en incubación sumergida en el anticuerpo primario anti-His, conjugado con peroxidasa en una dilución 1:5000 en PBS durante toda la noche a 4°C.

Al terminar esta incubación se lavó la membrana de nuevo y se sumergió en el segundo anticuerpo anti-Ratón, las bandas de proteínas se visualizaron con una solución de revelado (20 ml PBS; 0,0125 g 3,30-diaminobencidina Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.); y 100 µL de peróxido de hidrógeno 3 %), en la cual se sumergió la membrana. La reacción se detuvo cuando se transfirió la membrana al agua destilada. Por último, se dejó secar para apreciar mejor las bandas.

9. RESULTADOS

9.1 Amplificación del gen N a partir de muestras de pacientes positivos a COVID-19

En la figura 5 se muestra la amplificación del gen N a partir de muestras de cDNA provenientes de pacientes infectados con COVID-19, obteniendo resultados positivos en la muestra N43.

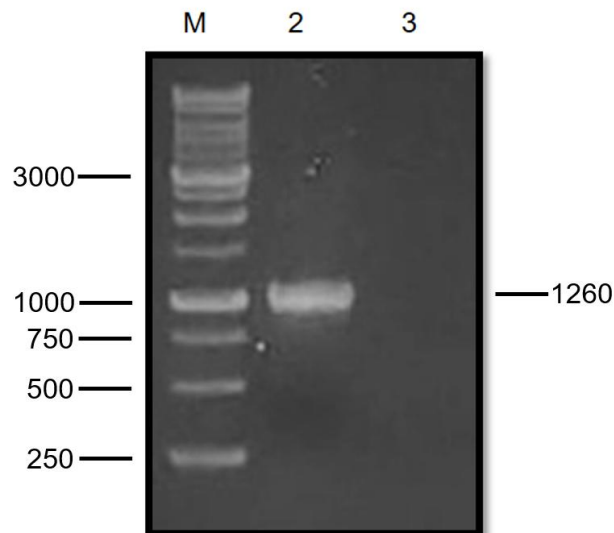


Figura 5. Electroforesis del gen N. Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio de la amplificación del gen N. Carril 1 Marcador de peso. Carril 2 muestra N43. Carril 3 Control negativo.

Como se observa en la figura anterior, se logró amplificar un producto en la muestra N43 que corresponde al peso molecular esperado de 1260 pb. No se obtuvieron productos inespecíficos, por lo que se infiere que el amplicón corresponde al gen N. En el control negativo no se observaron bandas, lo que confirma la especificidad del ensayo.

9.2 Clonación del gen N en el vector de resguardo pJET1.2

Las cajas fueron puestas en incubación a 37°C toda la noche y se observó el crecimiento de colonias puntiformes en el testigo positivo (Fig. 6B). En cuanto al testigo negativo no hubo crecimiento (Fig. 6A). Por otro lado, se observó crecimiento en la caja donde se sembraron las bacterias transformadas con la construcción plasmídica (Fig. 6C).

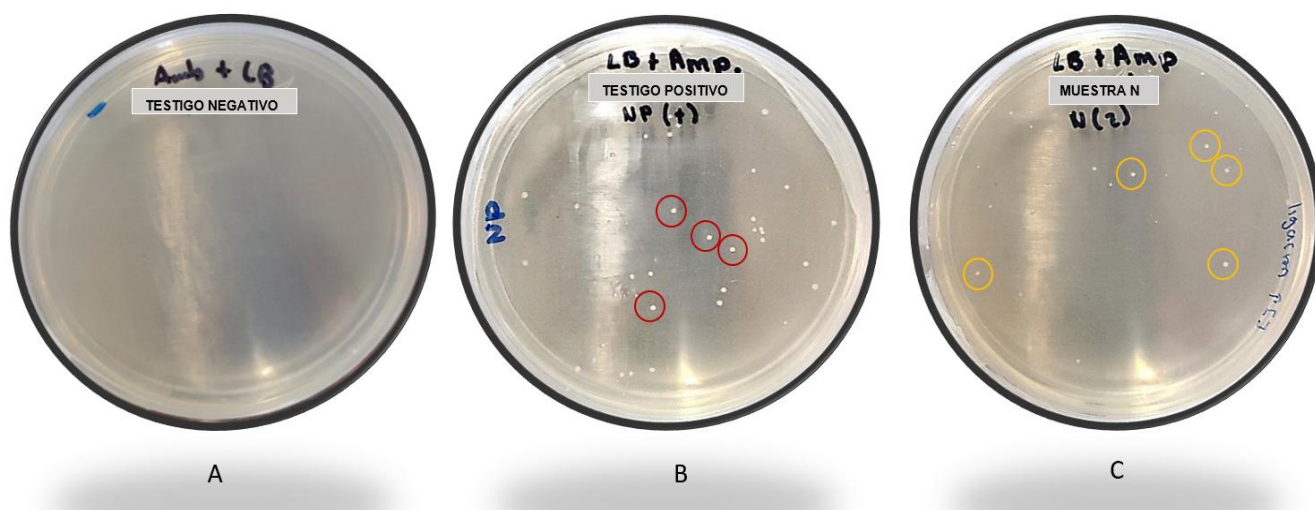


Figura 6. 6A. Testigo negativo. 6B. Testigo positivo. 6C.

Como se muestra en la figura anterior, en el testigo negativo (A) no se observó el crecimiento de colonias, por otro lado, en el testigo positivo (B) aparecieron colonias, redondas, blanquecinas, con borde bien definido, algunas se muestran dentro de los círculos de color rojo. En cuanto a la muestra se observa el crecimiento de colonias con las mismas características que el testigo positivo, a partir de esta caja se seleccionaron y aislaron cinco colonias las cuales se muestran dentro de los círculos color naranja, tomando en cuenta los resultados en los testigos, nuestra prueba fue válida, y las colonias son aptas para su análisis, y determinar cuál es la indicada para la siguiente subclonación.

Una vez extraídos los plásmidos pJET-N de las colonias seleccionadas, se procedió a analizarlos mediante PCR y determinar si habían clonado el gen de interés (Fig. 7).

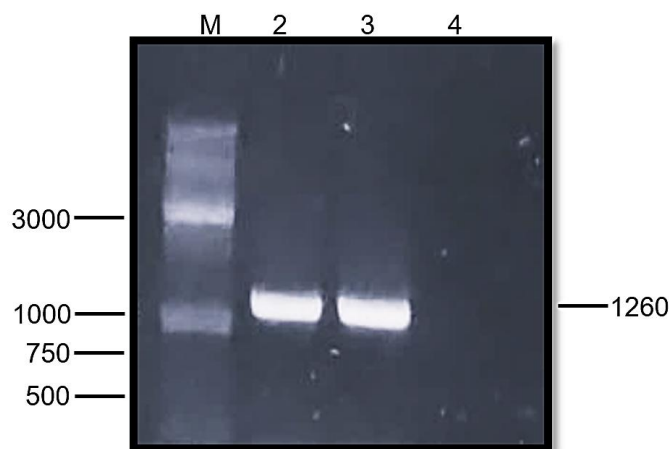


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio de la amplificación de las muestras de los plásmidos obtenidos. Carril 1 marcador, carril 2 y 3 amplicón de los plásmidos pJET-N, carril 4 testigo negativo.

Como se observa en la figura anterior, se logró amplificar el gen de interés en las muestras de los plásmidos analizados, obtenidos a partir de la clonación en el vector de resguardo. Se obtuvo el peso molecular esperado de 1260 pb. No se obtuvieron productos inespecíficos, por lo que se infiere que el amplicón corresponde al gen N. En el control negativo no se observaron bandas, lo que confirma la especificidad del ensayo.

9.3 Subclonación del gen N al vector de expresión pETSUMO

Después de realizar el protocolo de ligación a pETSUMO y la transformación de células, las colonias transformadas se cultivaron en LB-Kanamicina a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente se observaron los siguientes resultados (Fig. 8).

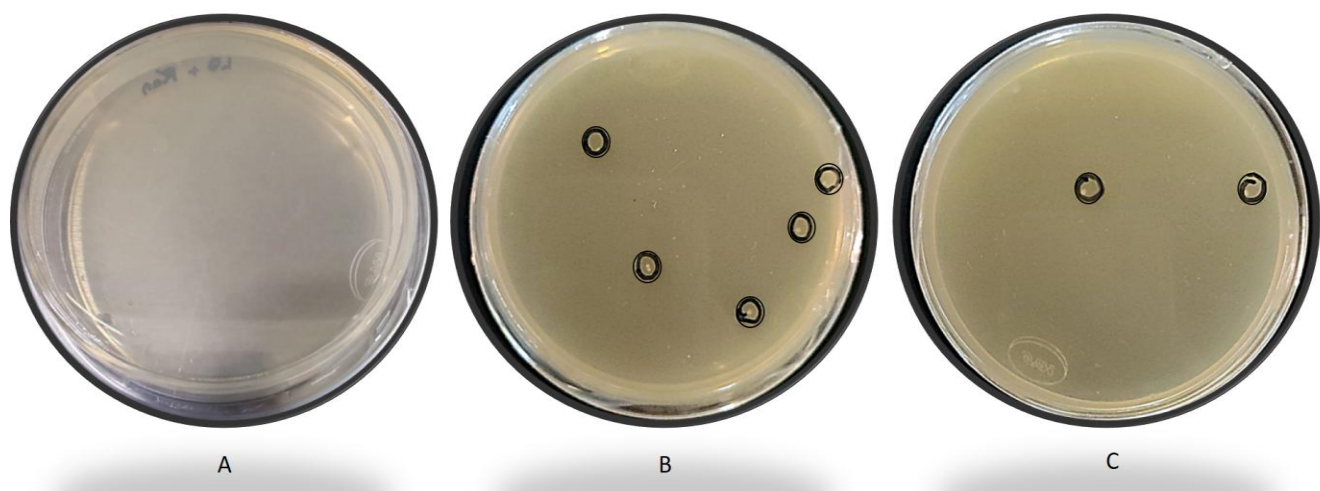


Figura 8. Cultivo de colonias transformadas. A Testigo negativo, B y C Colonias transformadas en Medio LB y Kanamicina.

La muestra presentó el crecimiento de colonias, de las cuales se seleccionaron 7 que se muestran dentro de los círculos negros, para verificar que la ligación fuera eficiente. Posteriormente se volvió a realizar la selección de otras 6 colonias obteniendo un total de 13 seleccionadas, a las cuales se les realizó el protocolo de extracción de plásmidos (Fig. 9).

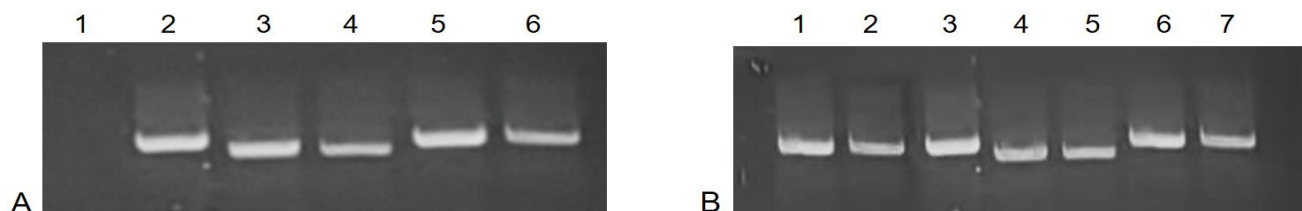


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa extracción de plásmidos de ligación a pETSUMO. Gel 1% teñido con bromuro de etidio de los plásmidos obtenidos después de la ligación al vector.

En la imagen anterior se muestran los 12 plásmidos resultantes de la subclonación al vector de expresión pETSUMO, en la figura A, se observa que en la muestra uno no se obtuvo plásmido, no obstante, en la figura B, todas las muestras presentaron el plásmido, dejando un total de 12 posibles plásmidos. Una vez obtenidos los plásmidos se realizó una PCR para verificar que realmente tuvieran el peso esperado, y descartar los plásmidos que no cumplieran con este criterio (Fig. 10 y 11) posteriormente se llevó a cabo otra PCR para evaluar la correcta orientación de los genes clonados.



Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de la correcta orientación de los genes clonados. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio de la amplificación de las muestras de plásmidos obtenidos, carril 1 marcador, carriles 2 al 6 corresponden a las muestras 2 al 6.

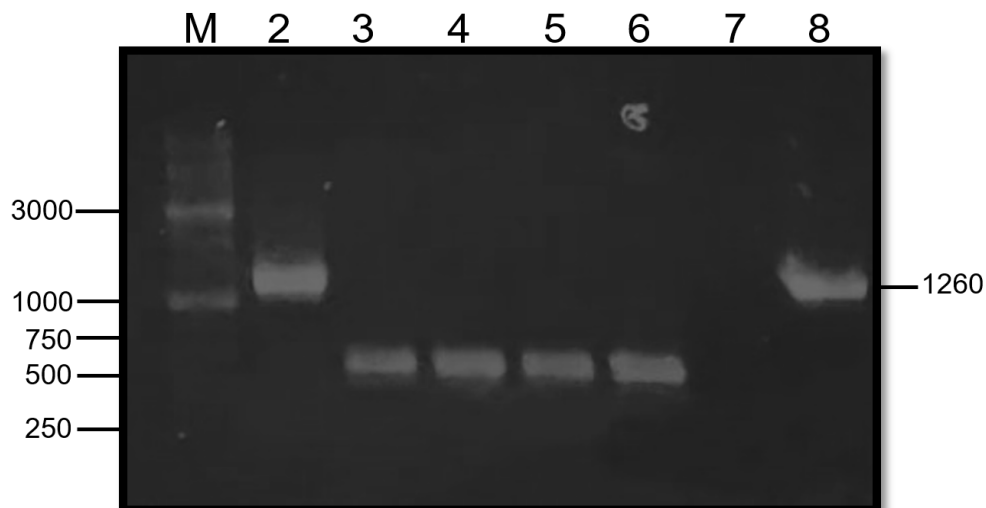


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de las muestras de plásmidos obtenidos. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio carril 1 marcador, carriles del 1 a las 7 muestras del 1 al 7.

En la figura anterior se puede observar que, de los 12 plásmidos obtenidos, únicamente las muestras 5 y 6 de un gel y 1 y 7 del segundo gel son los plásmidos que presentan un tamaño esperado. Después de obtener los plásmidos anteriores, se determinó que solamente los plásmidos 5 y 6 poseían el gen N en orientación, ya que se logró que amplificaran el fragmento de 1360 pb correspondiente al gen clonado en fase con el vector de expresión (Fig. 12).

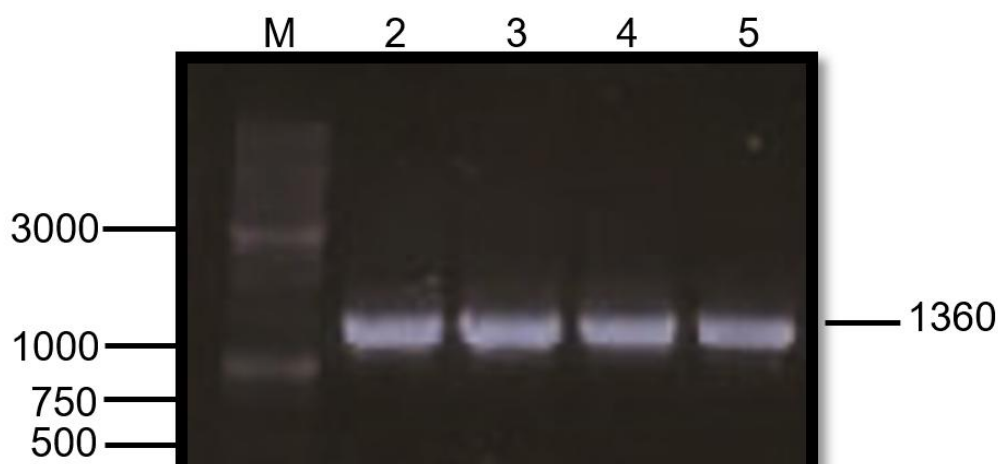


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio de la amplificación de muestras de los plásmidos obtenidos. Carril 1 Marcador, carril 2 y 4 muestra 5, carriles 3 y 5 muestra 6 de los plásmidos pETSUMO en fase con el gen N.

9.4 Ensayos de expresión en células One Shot BL21 (DE3)

En las figuras mostradas más adelante se observan las clonas correspondientes a las muestras de las cepas transformadas BL21-N-SARS-CoV2 (Fig. 13) de las cuales se obtuvieron un total de 10 clonas que fueron obtenidas satisfactoriamente y se llevaron a cabo las técnicas de western blot y Coomassie (Fig. 14).

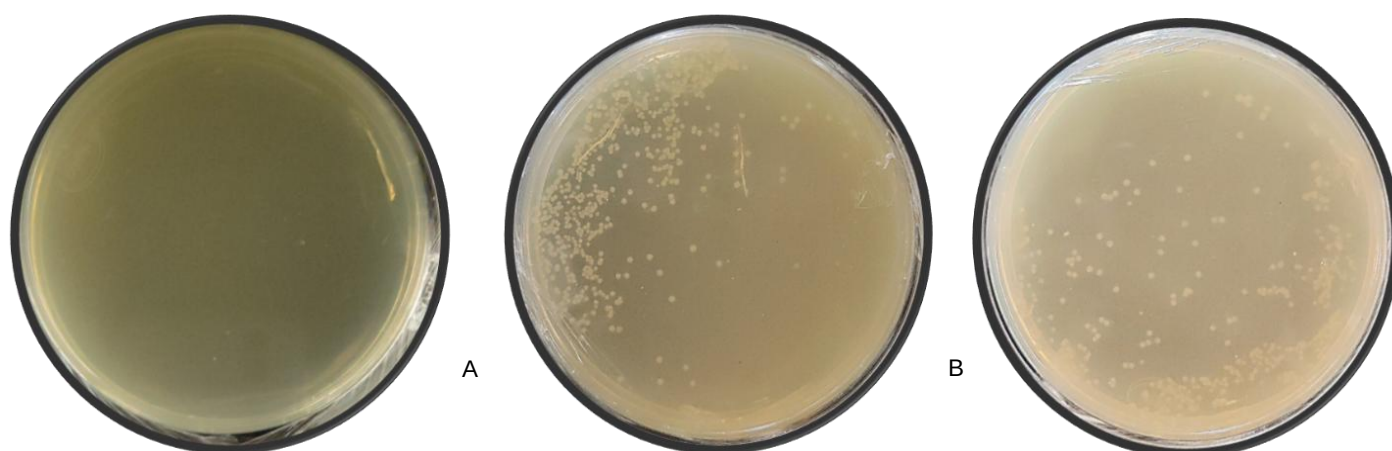


Figura 13. Pruebas de expresión A. Testigo negativo. B Clonas de la cepa BL21-N de COVID-19

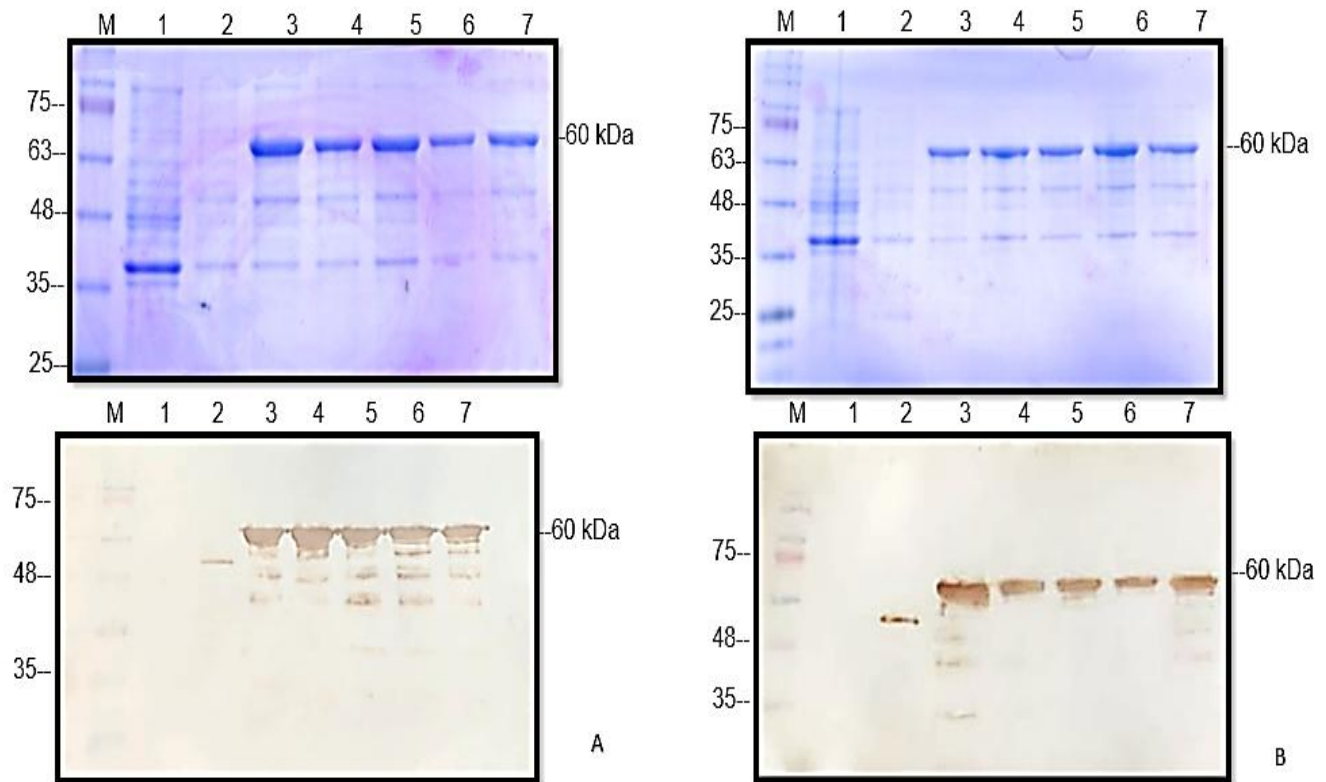


Figura 14. Pruebas de expresión de la cepa BL21-N de COVID-19. Arriba: gel SDS-PAGE teñido con azul de coomassie. M: marcador de peso molecular, 1: control positivo de expresión, 2 negativo, 3-7: diversas clonas analizadas de BL21-N. Abajo: western blot usando anticuerpos anti-6his. M: marcador de peso molecular, 1: control negativo, 2 control positivo de expresión, 3-7: diversas clonas analizadas de BL21-N.

Las 10 muestras tuvieron un resultado satisfactorio, con suficiente proteína, sin embargo, se eligió únicamente la muestra identificada con número 7 para realizar el proceso de expresión y purificación de la proteína.

9.5 Extracción de cuerpos de inclusión

Se tomaron alícuotas correspondientes a las distintas fases del proceso de producción de la muestra: inicialmente cuando se encontraba en células completas, y posteriormente tras la ruptura celular, obteniéndose la fracción soluble, la fracción insoluble y los cuerpos de inclusión. Estas muestras fueron sometidas a análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, con el objetivo de separar y caracterizar las proteínas presentes en cada fase.

Posteriormente fueron analizadas mediante western blot (Fig. 15) como se puede observar, se identificó que la proteína se encuentra en ambas fases, tanto en la fase soluble (carriles 4 de ambas figuras) y en los cuerpos de inclusión (carriles 5 de ambas figuras), lo cual concuerda con estudios que se han realizado previamente en los cuales también se han detectado porciones de la proteína en ambas fases (Djukic et al., 2021; Li et al., 2021; Di et al., 2021).

Esta información resulta de utilidad para el procedimiento de purificación de la proteína, ya que podríamos obtenerla de ambas fases, y en el caso de que se encuentre en la fase soluble, podríamos prescindir del proceso de solubilización, no obstante, se requieren más ensayos para poder determinar cómo se realizará esta parte.

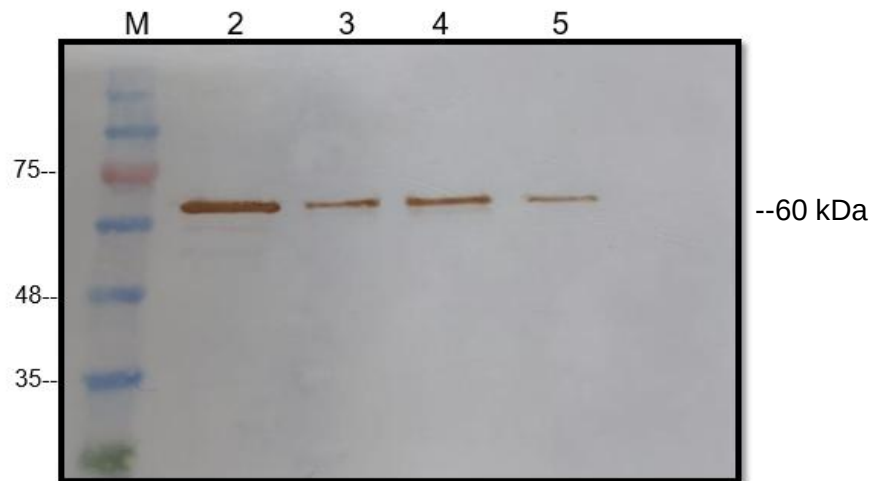


Figura15. Expresión de la proteína N en *E. coli*. Western Blot con anticuerpos anti-his de las clonas inducidas con IPTG. Carril 1 Marcador, carril 2 Células completas, carril 3 fase sólida, carril 4 fase soluble, carril 5 cuerpos de inclusión.

Con el fin de obtener el mejor método de solubilización, probaron diferentes ensayos para el tratamiento de los cuerpos de inclusión se observó que el método de rompimiento con perlas de vidrio y periodos de enfriamiento en hielo resulta eficaz ya que se evita el sobrecalentamiento de la muestra y la posible degradación de proteína.

Ensayo	Volumen de expresión	Banda WB	Resultado
BL21/DE3 LOTE 1	200 ml		No se encontró proteína en la purificación.
BL21/DE3 LOTE 2	200 ml		No se encontró proteína en la purificación.
BL21/DE3 LOTE 3	100 ml		Se realizaron lavados con urea, y la proteína no se encontró en el WB.
BL21/DE3 LOTE 4	200 ml		Rompimiento con perlas de vidrio y lavados con urea

Tabla 6. Ensayos de tratamiento a cuerpos de inclusión. Tratamiento a 4 lotes de células BL21 DE3 sometidos a diferentes condiciones de rompimiento.

9.6 Análisis de secuenciación

Con base en los resultados de la secuenciación del plásmido pETSUMO-NSARS-CoV2 se logró confirmar la correcta integración del gen que codifica la proteína N (Nucleocápside) del SARS CoV2 en el sistema de expresión, lo que concuerda con la Figura 16A en la cual se muestran los productos en el tamaño esperado

El mapa plásmidico obtenido (Fig. 16B) tiene un total de 6906 pb y muestra la distribución de los elementos que garantizan la replicación y expresión de la proteína de interés.

Posteriormente y con base en el análisis del electroferograma correspondiente a la secuencia codificante a la proteína N, se pudo realizar un análisis de secuencias mediante BLAST-NCBI para determinar el porcentaje de homología de la secuencia analizada con respecto a las cepas reportadas de SARS-CoV-2. El análisis de secuencias mostró una homología del 100% en comparación con las secuencias en la base de datos de NCBI.

El resultado del programa Seqbuilder muestra el siguiente mapa plásmidico denominado pET SUMO-N SARS CoV2 en el cual podemos resaltar el gen N SARS CoV2 (flecha roja) el cual esquematiza el inserto principal, cuya secuencia fue verificada y confirmada (Fig. 16B).

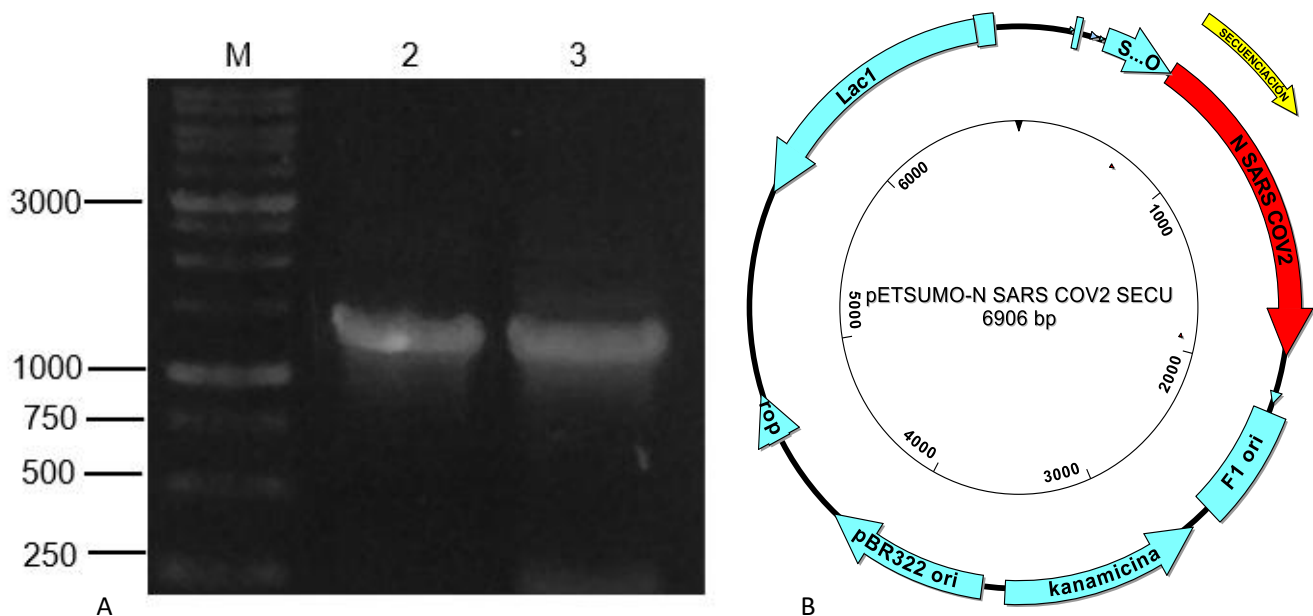


Figura 16. A. Electroforesis en gel de agarosa 0.7% teñido con bromuro de etidio. Carriles 2 y 3 se muestran los amplicones en el tamaño esperado. B. Mapa plásmidico del vector denominado pET SUMO-N SARS CoV2.

10. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Una vez obtenido el gen de la proteína fue adecuadamente clonado en el vector de resguardo. Posteriormente se realizó una segunda clonación en el vector de expresión pETSUMO. Se determinó que se encontraba en fase con el vector de expresión ya que el peso aumentó aproximadamente 100pb con respecto a la caracterización mediante PCR.

El plásmido pETSUMO N fue utilizado para transformar la cepa BL21-N mediante la inducción por IPTG tal y como se ha descrito en otros trabajos (Djukic et al., 2021, Li et al., 2021) y mediante las pruebas de expresión, se corroboró la presencia de la proteína de interés, con base en los análisis de western blot, en la cual se utilizaron anticuerpos anti-His. Se obtuvo la proteína recombinante con un peso molecular aproximado de 60 kDa dando una señal específica en la colonia utilizada.

Se probaron diversos ensayos para realizar las técnicas de rompimiento, utilizando homogenizador industrial y, por otro lado, promoviendo el rompimiento mediante ciclos de vortexeo con perlas de vidrio, el cual resulta eficaz ya que no es necesario someter la muestra a altas temperaturas y se evita la degradación de la proteína (Tabla 6).

Como se mencionó anteriormente, una sobreexpresión del gen heterólogo puede inducir la formación de cuerpos de inclusión. Di y colaboradores (2021) utilizaron un tratamiento con urea a altas concentraciones para promover el desdoblamiento, al igual que en el presente trabajo que utilizamos urea al 9%, como parte de los varios tratamientos que se implementaron. También se utilizó un buffer de solubilización (SDS, betamercaptoetanol, tris-HCl 1 M, aforado a 50 ml) para ayudar a desagregar los cuerpos de inclusión, el cual fue eliminado posteriormente mediante la diálisis de la muestra, posterior a este paso, se realizó un Western Blot y se encontró la presencia de la proteína.

Con respecto a la parte de la purificación, los primeros ensayos resultaron satisfactorios ya que obtuvimos el cromatograma típico de una cromatografía IMAC, no obstante, al momento de recolectar las alícuotas posterior a la elusión, la proteína no se encontró presente, esto con base en los resultados del western blot posterior, lo cual pudo deberse a la concentración de imidazol que se utilizó, ya que en estudios similares, como fue el caso de Li et al. (2021) se descubrió que la proteína N podía unirse fuertemente a la resina catiónica; por lo tanto probaron con concentraciones relativamente altas de NaCl₂.

Al igual que, Djukic et al. (2021), que probaron con una concentración de 500 mM de NaCl_2 en tampón de equilibrio, aumentando la fuerza iónica y la concentración resultante para lograr la elusión, lo cual tiene sentido ya que la proteína N es altamente cargada y muy básica y esto promueve que se una fuertemente a la matriz, por lo cual podemos deducir que, al aumentar la fuerza iónica, se reducen las interacciones ya que los iones compiten con las cargas de la proteína; esto reduce la unión de la proteína a la matriz. Por otro lado, en ese mismo estudio, probaron con diferentes concentraciones de imidazol y probando con un pH de 7.2.

En nuestro caso tanto los reactivos como la muestra se estandarizaron a un pH de 8, motivo por el cual se cree que la proteína no logró desprenderse de la matriz. Tarczewska y colaboradores (2022) mencionan que la función básica de esta proteína es unirse al ARN genómico y formar un nucleocápside protector en el virión maduro. Esta capacidad de la proteína N de interactuar con los ácidos nucleicos provoca dificultad en el proceso de purificación y que los métodos empleados habitualmente para este fin sean insuficientes para eliminar la contaminación por ácidos nucleicos. Como sabemos la superficie de la proteína N está cargada positivamente y el ARN está cargado negativamente, lo que provoca que los condensados sean impulsados por efectos electrostáticos. Por lo cual el último objetivo planteado en el presente trabajo con respecto a la evaluación antigénica ya no pudo llevarse a cabo.

El análisis final del mapa plásmidico confirma la correcta inserción de nuestro gen de interés, lo cual nos brinda las bases necesarias para la correcta expresión de la proteína N recombinante. Con estos resultados obtenemos un sistema de expresión recombinante de la proteína de interés. El desarrollo biotecnológico obtenido durante este proyecto constituye un avance hacia la obtención de antígenos recombinantes con múltiples aplicaciones posibles, como sistemas de detección, inmunización o herramientas de investigación dentro del enfoque “one health” (una sola salud), ya que la proteína N del SARS CoV2 presenta alta inmunogenicidad y abundancia en el virión, y su aplicación puede desencadenar aplicaciones innovadoras en un futuro.

En este sentido, se plantea la posibilidad de que el proyecto continúe orientado a la estandarización de la purificación de la proteína N con el objetivo de darle continuidad a la parte de la evaluación antigénica, lo cual fortalecerá el presente trabajo, pero también, garantizar que sea una metodología reproducible y funcional, ya que teniendo protocolos de purificación estandarizados podemos facilitar la incorporación de esta proteína a nuevas tecnologías de diagnóstico, detección o contención.

11. CONCLUSIONES

- ✓ Se lograron amplificar de manera exitosa los genes a partir de una muestra obteniendo el producto del tamaño esperado (1260 pb).
- ✓ Se obtuvo una eficiente clonación en el vector de resguardo PJET1.2/blunt.
- ✓ Al llevar a cabo la clonación del gen N en el vector de expresión pETSUMO se obtuvo un sistema de expresión recombinante para la proteína N del SARS-CoV 2.
- ✓ La proteína se expresa eficientemente y en una alta producción de proteína en fases solubles e insolubles.
- ✓ Los primeros ensayos de expresión indican que la proteína se puede encontrar tanto en fase soluble como en cuerpos de inclusión, sin embargo, con respecto al primer ensayo se sugiere que la mayor parte de la proteína se encuentra en fase soluble, lo que concuerda con lo reportado en la literatura, no obstante, se requieren más estudios.
- ✓ En los ensayos de purificación se obtuvo un cromatograma típico de una cromatografía IMAC. Se requieren más ensayos para confirmar la presencia de la proteína purificada.
- ✓ Se detectó la necesidad de evaluar métodos alternativos de solubilización con el fin de estandarizar el procesamiento de los cuerpos de inclusión obtenidos y poder obtener la proteína en forma soluble para su posterior purificación.
- ✓ Se confirmó la correcta integración del gen que codifica la proteína N (nucleocápside) del SARS-CoV-2 en un sistema de expresión bacteriano.
- ✓ El análisis de secuencias mostró una homología del 100% en comparación con las secuencias en la base de datos de NCBI de la proteína resultante.
- ✓ Se logró obtener satisfactoriamente un sistema de expresión recombinante de la proteína N del SARS-CoV-2 en la cepa de expresión de *E. coli*.

12. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDADES	1°TRIMESTRE			2°TRIMESTRE			3°TRIMESTRE		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Curso seminario y Trabajo experimental I,II,II	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Clonación y cepa de producción BL21/DL3 pETSUMO-N	X	X	X						
Realizar la expresión y purificación de la proteína recombinante N en un sólo paso mediante cromatografía de afinidad.				X	X	X			
Análisis de resultados							X	X	X
Revisión bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Escritura de proyecto	X	X	X	X	X	X	X	X	X

13. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Moneim, A. S., & Abdelwhab, E. M. (2020). Evidence for SARS-CoV-2 infection in animal hosts. *Pathogens*, 9(7), 529. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070529>
- Almeshdi, A. M., Khoder, G., Alchakee, A. S., Alsayyid, A. T., Sarg, N. H., & Soliman, S. S. M. (2021). SARS-CoV-2 spike protein: pathogenesis, vaccines, and potential therapies. *Infection*, 49(5), 855-876. doi:10.1007/s15010-021-01677-8
- Ávila de Tomás, J. F. (2020). Coronavirus COVID-19: Patogenia, prevención y tratamiento (4ª ed.). SalusPlay. ISBN: 978-84-16861-95-8. <https://ebevidencia.com/wp-content/uploads/2020/03/CORONAVIRUS-COVID-19-4%C3%82%C2%AA-Ed-18.03.2020.pdf>
- Baggen, J., Vanstreels, E., Jansen, S., et al. (2021). Cellular host factors for SARS-CoV-2 infection. *Nature Microbiology*, 6(9), 1219–1232. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00958-0>
- Bai, Z., Cao, Y., Liu, W. y Li, J. (2021). La proteína nucleocápside del SARS-CoV-2 y su papel en la estructura viral, funciones biológicas y posible diana para la mitigación mediante fármacos o vacunas. *Viruses*, 13 (6), 1115. <https://doi.org/10.3390/v13061115>
- Bedford, E. (2020). Número de perros y gatos mantenidos como mascotas en todo el mundo en 2018. Statista. <https://www.statista.com/statistics/1044386/dog-and-cat-pet-population-worldwide>
- de Anda-Jáuregui, G., Gómez-Romero, L., Cañas, S., Campos-Romero, A., Alcántar-Fernández, J., & Cedro-Tanda, A. (2024). COVID-19 reinfections in Mexico City: implications for public health. *Frontiers in public health*, 11, 1321283. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1321283>
- de Pinho Favaro, M. T., Atienza-Garriga, J., Martínez-Torró, C., Parladé, E., Vázquez, E., Corchero, J. L., Villaverde, A. (2022). Recombinant vaccines in 2022: a perspective from the cell factory. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 203. doi:10.1186/s12934-022-01929-8
- Di, D., Dileepan, M., Ahmed, S., Liang, Y., & Ly, H. (2021). Recombinant SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein: Expression, Purification, and Its Biochemical Characterization and Utility in Serological Assay Development to Assess Immunological Responses to SARS-CoV-2 Infection. *Pathogens*, 10(8), 1039. <https://doi.org/10.3390/pathogens10081039>

- Djukic, T., Mladenovic, M., Stanic-Vucinic, D., Radosavljevic, J., Smiljanic, K., Sabljic, L., Devic, M., Cujic, D., Vasovic, T., Simovic, A., Radomirovic, M., & Cirkovic Velickovic, T. (2021). Expression, purification and immunological characterization of recombinant nucleocapsid protein fragment from SARS-CoV-2. *Virology*, 557, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.01.004>
- Escudero, Xavier, Guarnier, Jeannette, Galindo-Fraga, Arturo, Escudero-Salamanca, Mara, Alcocer-Gamba, Marco A., & Río, Carlos Del. (2020). La pandemia de Coronavirus SARS-CoV-2 (COVID-19): Situación actual e implicaciones para México. *Archivos de cardiología de México*, 90(Supl. 1), 7-14. Epub 24 de marzo de 2021. <https://doi.org/10.24875/acm.m20000064>
- Feng, W., Xiang, Y., Wu, L., et al. (2022). La proteína de la nucleocápside del SARS-CoV-2 es una diana potencial para el desarrollo de una nueva generación de vacunas. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(1), e24479. <https://doi.org/10.1002/jcla.24479>
- García, A., Pavón-Romero, G., Carreto-Binaghi, L., Anzaldo, J., & Alvarado-Amador, I. (2020). Etiología y fisiopatología del SARS-CoV-2. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, 33, 5-9. doi:10.35366/96667
- García-Cordero, J., Mendoza-Ramírez, J., Fernández-Benavides, D., Roa-Velázquez, D., Filisola-Villaseñor, J., Martínez-Frías, SP, Sánchez-Salguero, ES, Miguel-Rodríguez, CE, Maravillas Montero, JL, Torres-Ruiz, JJ, Gómez-Martín, D., Argumedo, LS, Morales-Ríos, E., Alvarado-Orozco, JM y Cedillo-Barrón, L. (2021). Expresión de proteínas recombinantes y purificación de N, S1 y RBD del SARS-CoV-2 de células de mamíferos y sus posibles aplicaciones. *Diagnóstico*, 11 (10), 1808. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11101808>
- García Cambrón, J. (2020). "Construcción del primer sistema de expresión para la proteína de matriz (M) del Rubulavirus porcino como antígeno potencial en el control de la enfermedad del ojo azul de cerdos". [Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa]
- Gorkhali, R., Koirala, P., Rijal, S., Mainali, A., Baral, A., & Bhattarai, H. K. (2021). Structure and Function of Major SARS-CoV-2 and SARS-CoV Proteins. *Bioinformatics and Biology Insights*, 15, 11779322211025876. doi:10.1177/11779322211025876

- Grifoni, A., Sidney, J., Zhang, Y., Scheuermann, R. H., Peters, B., & Sette, A. (2020). A sequence homology and bioinformatic approach can predict candidate targets for immune responses to SARS-CoV-2. *Cell Host & Microbe*, 27(4), 671–680.e2. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.002>
- Guo, Z., Tang, Y., Zhang, Z., Liu, J., Zhuang, Y., & Li, T. (2024). COVID-19: From immune response to clinical intervention. *Precision Clinical Medicine*, 7(3), pbae015. <https://doi.org/10.1093/pcmedi/pbae015>
- Harrison, A. G., Lin, T., & Wang, P. (2020). Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends in Immunology*, 41(12), 1100–1115. doi:10.1016/j.it.2020.10.004
- Hassell, J. M., Begon, M., Ward, M. J., & Fèvre, E. M. (2017). Urbanization and Disease Emergence: Dynamics at the Wildlife-Livestock-Human Interface. *Trends in Ecology & Evolution*, 32(1), 55–67. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.09.012>
- Hobbs, C. E., & Reid, T. J. (2021). Animals and SARS-CoV-2: Species susceptibility and viral transmission in experimental and natural conditions, and potential implications for community spread. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68, 1850–1867. <https://doi.org/10.1111/tbed.13885>
- Huang, Y., Chen, J., Chen, S., Huang, C., Li, B., Li, J., Jin, Z., Zhang, Q., Pan, P., Du, W., Liu, L., & Liu, Z. (2024). ** Molecular characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 14*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1415885>
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature reviews. Microbiology*, 19(3), 141–154. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- Jackwood, M. W. (2012). Review of infectious bronchitis virus worldwide. *Avian Diseases*, 56(4), 634–641 <https://doi.org/10.1637/10227-043012-Review.1>
- Jackson, C. B., Farzan, M., Chen, B., & Choe, H. (2022). Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *23*(1), 3–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>
- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451(7181), 990–993. <https://doi.org/10.1038/nature06536>

- Kakavandi, S., Zare, I., VaezJalali, M., Dadashi, M., Azarian, M., Akbari, A., . . . Hajikhani, B. (2023). Structural and non-structural proteins in SARS-CoV-2: potential aspects to COVID-19 treatment or prevention of progression of related diseases. *Cell Communication and Signaling*, 21(1), 110. doi:10.1186/s12964-023-01104-5
- Lara, Álvaro R. (2011). Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(2), 209-223. Recuperado en 16 de julio de 2025, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382011000200006&lng=es&tlng=es
- Li, G., Li, W., Fang, X., Song, X., Teng, S., Ren, Z., Hu, D., Zhou, S., Wu, G., & Li, K. (2021). Expression and purification of recombinant SARS-CoV-2 nucleocapsid protein in inclusion bodies and its application in serological detection. *Protein Expression and Purification*, 186, 105908. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105908>
- Licitra, BN, Duhamel, GE y Whittaker, GR (2014). Coronavirus entéricos caninos: patógenos virales emergentes con proteínas de espícula recombinantes distintivas. *Viruses*, 6 (8), 3363-3376. <https://doi.org/10.3390/v6083363>
- Liu, P., Jiang, J.-Z., Wan, X.-F., Hua, Y., Li, L., Zhou, J., & others. (2020). ¿Are pangolins the intermediate host of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2)? *PLoS Pathogens*, 16(5), e1008421. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008421>
- Matsuo, T. (2021). Viewing sars-cov-2 nucleocapsid protein in terms of molecular flexibility. *Biol. (Basel)* 10, 454. doi: 10.3390/biology10060454
- Machhi, J., Herskovitz, J., Senan, A. M., Dutta, D., Nath, B., Oleynikov, M. D., . . . Kevadiya, B. D. (2020). The Natural History, Pathobiology, and Clinical Manifestations of SARS-CoV-2 Infections. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 15(3), 359-386. doi:10.1007/s11481-020-09944-5
- Martínez-Anaya, C., Ramos-Cervantes, P. y Vidaltamayo, R. (2020). Coronavirus, diagnóstico y estrategias epidemiológicas contra CO-VID-19 en México. *Educación Química*. Vol 31(2), 12-22. <https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2020.2.75378>
- Minskaia, M., Hertzog, T., Gorbalenya, A. M., Campanacci, V., Cambillau, D. O., Buló, B., & Ziebuhr, J. (2006). Discovery of a 3'→5' exoribonuclease in coronavirus RNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(13), 5108–5113. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508200103>

- Thura, M., Sng, J. X. E., Ang, K. H., Li, J., Gupta, A., Hong, J. M., Hong, C. W., & Zeng, Q. (2021). Targeting intra-viral conserved nucleocapsid (N) proteins as novel vaccines against SARS-CoVs. *Bioscience reports*, 41(9), BSR20211491. <https://doi.org/10.1042/BSR20211491>
- Mora-Díaz, J. C., Piñeyro, P. E., Houston, E., Zimmerman, J., & Giménez-Lirola, L. G. (2019). Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus: A review. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 53. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00053>
- Monserrat Sanz, J., Gómez Lahoz, A. M., & Oliva Martín, R. (2021). Role of the immune system in SARS-CoV-2 infection: Immunopathology of COVID-19. *Medicina Clínica*, 13(33), 1917–1931. <https://doi.org/10.1016/j.med.2021.05.005>
- Mortari, E. P., Ferrucci, F., Zografaki, I., Carsetti, R., & Pacelli, L. (2025). T and B cell responses in different immunization scenarios for COVID-19: A narrative review. *Frontiers in Immunology*, 16, 1535014. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1535014> (doi.org in Bing)
- Peciak, K., Tommasi, R., Choi, J.-w., Brocchini, S., & Laurine, E. (2014). Expression of soluble and active interferon consensus in SUMO fusion expression system in *E. coli*. *Protein Expression and Purification*, 99, 18-26. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.03.009>
- Peng, X.-L., Cheng, J.-S.-Y., Gong, H.-L., Yuan, M.-D., Zhao, X.-H., Li, Z., & Wei, D.-X. V'kovski Medical Research, 8(1), 67. doi:10.1186/s40779-021-00360-1
- V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2021). Coronavirus biology and replication: Implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), 155–170. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
- Robson, B. (2020). Computers and viral diseases. Preliminary bioinformatics studies on the design of a synthetic vaccine and a preventative peptidomimetic antagonist against the SARS-CoV-2 (2019-nCoV, COVID-19) coronavirus. *Computers in Biology and Medicine*, 119, 103670. doi:<https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2020.103670>
- Saif, L. J. (2010). Bovine respiratory coronavirus. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 26(2), 349–364. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.04.005>
- SAIF LJ. Coronavirus animales: ¿qué nos pueden enseñar sobre el síndrome respiratorio agudo severo? *Scientific & Technical Review*. 2004 01 1; 23(2): p. 643-660. doi: <http://dx.doi.org/10.20506/rst.23.2.1513>

- Santos-López, G., Cortés-Hernández, P., Vallejo-Ruiz, V., & Reyes-Leyva, J. (2021). *SARS-CoV-2: generalidades, origen y avances en el tratamiento*. *Gaceta Médica de México*, 157*(1), 88–93. <https://doi.org/10.24875/gmm.20000505>
- Satarker, S., & Nampoothiri, M. (2020). Structural Proteins in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2. *Archives of Medical Research*, 51(6), 482-491. doi: 10.1016/j.arcmed.2020.05.012
- Siri wattananon, K., Manopwisedjaroen, S., Kanjanasirirat, P., Budi Purwono, P., Rattanapisit, K., Shanmugaraj, B., Phoolcharoen, W. (2021). Development of Plant-Produced Recombinant ACE2-Fc Fusion Protein as a Potential Therapeutic Agent Against SARS-CoV-2. *Frontiers in Plant Science*, 11. doi:10.3389/fpls.2020.604663
- Sofi, M. S., Hamid, A., & Bhat, S. U. (2020). SARS-CoV-2: A critical review of its history, pathogenesis, transmission, diagnosis and treatment. *Biosafety and Health*, 02(04), 217-225. doi: doi: 10.1016/j.bsheal.2020.11.002
- Song, Z., Xu, Y., Bao, L., Zhang, L., Yu, P., Qu, Y., Zhu, H., Zhao, W., Han, Y., & Qin, C. (2019). From SARS to MERS: Thrusting coronaviruses into the spotlight. *Viruses*, 11(1), 59. <https://doi.org/10.3390/v11010059>
- Song, D., Moon, H., & Kang, B. (2015). Porcine epidemic diarrhea: Current epidemiology and available vaccines. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 4(2), 166–176. <https://doi.org/10.7774/cevr.2015.4.2.166>
- Tarczewska, A., Kolonko-Adamska, M., Zarębski, M., Dobrucki, J., Ożyhar, A., & Greb-Markiewicz, B. (2022). The method utilized to purify the SARS-CoV-2 N protein can affect its molecular properties. *Protein Expression and Purification*, 194, 106019. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2022.106019>
- Vlasova, A. N., Wang, Q., Jung, K., Langel, S. N., Malik, Y. S., & Saif, L. J. (2020). Porcine coronaviruses. In Y. Malik, R. Singh, & M. Yadav (Eds.), *Emerging and transboundary animal viruses: Livestock diseases and management* (pp. 223–252). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0402-0_4
- (WHO), W. H. O. (2024). COVID-19 eliminated a decade of progress in global level of life expectancy. Retrieved from <https://www.who.int/news/item/24-05-2024-covid-19-eliminated-a-decade-of-progress-in-global-level-of-life-expectancy>
- Yoshimoto, F. K. (2020). The Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the Cause of COVID-19. *The Protein Journal*, 39(3), 198-216. doi:10.1007/s10930-020-09901-4

- Zang, J., Zhu, Y., Zhou, Y., Gu, C., Yi, Y., Wang, S., . . . Huang, Z. (2021). Yeast-produced RBD-based recombinant protein vaccines elicit broadly neutralizing antibodies and durable protective immunity against SARS-CoV-2 infection. *Cell Discovery*, 7(1), 71. doi:10.1038/s41421-021-00315-9
- Zawilska, J. B., Lagodzinski, A., & Berezinska, M. (2021). COVID-19: from the structure and replication cycle of SARS-CoV-2 to its disease symptoms and treatment. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*, 72(4), 10.26402/jpp.2021.4.01. <https://doi.org/10.26402/jpp.2021.4.01>

14. ANEXOS



Defensa

Secretaría de la Defensa Nacional

Unidad de Especialidades Médicas

Otorga la presente

CONSTANCIA

a:

Roxana Pastrana Unzueta

Por su participación como **ASISTENTE** al
“XXV Curso de Actualidades en Técnicas de Laboratorio Clínico”
Llevado a cabo en la Unidad de Especialidades Médicas, promoviendo la excelencia en el
desempeño profesional mediante la actualización constante.

Fecha: 28 de Marzo del 2025.
Duración del Curso: 7 horas.



Profesora Titular del Curso.
Teniente Coronel Enfermera.
Ana María Vásquez Domínguez.



Director.
General Brigadier Méd. Cir.
Antonio García Ruiz.



Jefa del Dep. de Enseñanza e
Investigación.
Coronel Enfermera.
Mónica Gabriela Hashizume Valenzuela.



Folio: 2YP5FU-CE000088

Campo Militar No. 1-K, Lomas de San Isidro, Naucalpan, Méx., a 28 de Marzo del 2025.



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Secretaría de Posgrado e Investigación

Otorgan la presente

Constancia

A: Roxana Pastrana Unzueta

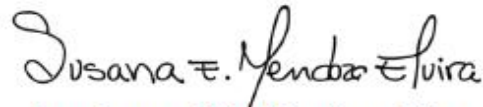
Por su participación como **Asistente en el**
3er Congreso Nacional e Internacional de Ciencias Multidisciplinarias
Realizado del 22 al 24 de abril de 2025 en la Unidad de Seminarios
Dr. Jaime Keller Torres, Campo Cuatro.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Estado de México, abril de 2025.




Dr. David Quintanar Guerrero
Director

Folio: 202500202


Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira
Secretaria de Posgrado e Investigación



#51gamosConMás
INVESTIGACIÓN



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Departamento de Ciencias Biológicas
Sección de Bioquímica y Fisiología Agropecuaria
PAPIIT TA200324

Otorga la presente

CONSTANCIA

**A: R. Pastrana Unzueta; J.L. Cerriteño-Sánchez, S.
Cuevas Romero, G. Blancas Flores**

Por su participación como ponente de la conferencia

**EProducción de la proteína recombinante
N del SARS-COV2 con potencial aplicación
en el área veterinaria.**

**En el 5º Congreso Internacional en Ciencias Veterinarias
y Producción Animal** realizado a
distancia el 6 y 7 de noviembre de 2025.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, noviembre de 2025.



Folio: 202500535

Dr. David Quintanar Guerrero
Director





Gobierno de
México

Agricultura
Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural



El Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias

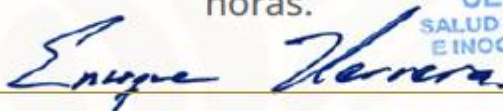
otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A

**QFB. Roxana Pastrana
Unzueta**

Por su participación como Instructora en el Curso
"BIOTECNOLOGÍA APLICADA A LA INMUNOLOGÍA: DE
LAS PLATAFORMAS MOLECULARES A LA CLÍNICA",
realizado en el Instituto de Estudios Superiores en
Biotecnología Médica, Puebla de Zaragoza, Puebla, el
día 05 de diciembre de 2025, con una duración de 2
horas.



M. en C. Enrique Herrera López
Director del CENID SAI

Puebla de Zaragoza, Puebla, 05 de diciembre de 2025



2025
Año de
La Mujer
Indígena



Gobierno de
México

Agricultura
Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural



El Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias

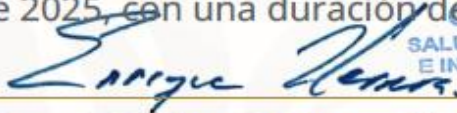
otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A

**QFB. Roxana Pastrana
Unzueta**

Por su participación como Instructora en el Curso
"DESARROLLO INTEGRAL Y COLABORATIVO PARA LA
PRODUCCIÓN PORCINA DESDE EL ENFOQUE DE UNA
SOLA SALUD", realizado en la Unidad de Enseñanza
Agropecuaria del Bachillerato Tecnológico
Agropecuario, Xalatlaco, Estado de México, el día 17 de
octubre de 2025, con una duración de 2 horas.



M. en C. Enrique Herrera López
Director del CENID SAI

Estado de México, 17 de octubre de 2025



2025
Año de
La Mujer
Indígena



Gobierno de
México

Agricultura
Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural



El Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias

otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A

**QFB. Roxana
Pastrana Unzueta**

Por su participación como Instructora en el Curso
"PESTE PORCINA AFRICANA, UNA AMENAZA LATENTE
PARA MÉXICO", realizado en el Auditorio principal de
San Bartolo Oxtotitlán, Jiquipilco, el día 09 de diciembre
de 2025, con una duración de 1 hora.



M. en C. Enrique Herrera López
Director del CENID SAI

CENID
SALUD ANIMAL
E INOCUIDAD

Jiquipilco, Estado de México, 09 de diciembre de 2025



2025
Año de
La Mujer
Indígena



INSTITUTO DE ESTUDIOS SUPERIORES EN
BIOTECNOLOGÍA MÉDICA

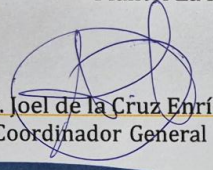
Otorga el presente:

Reconocimiento

a

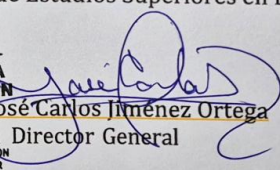
OTFB. Roxana Pastrana Unzueta

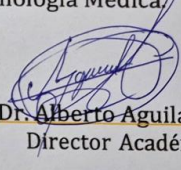
Por haber impartido la conferencia titulada "**Antígenos recombinantes en enfermedades infecciosas (SARS-CoV-2)**" durante el ciclo de conferencias "Biotecnología aplicada a la inmunología de las plataformas moleculares", el día 05 de diciembre de 2025, en las instalaciones del Plantel La Paz del Instituto de Estudios Superiores en Biotecnología Médica.


MC. Joel de la Cruz Enríquez
Coordinador General


**SECRETARÍA
DE EDUCACIÓN
PÚBLICA**

SUBSECRETARÍA DE
EDUCACIÓN SUPERIOR
DIRECCIÓN DE EDUCACIÓN
SUPERIOR PARTICULAR
Instituto de Estudios Superiores
en Biotecnología Médica
C.P. 71450083A
Puebla


José Carlos Jiménez Ortega
Director General


Dr. Alberto Aguilar Álvarez
Director Académico



SEMS
SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN
MEDIA SUPERIOR

DGETAyCM
Dirección General de Educación
Tecnológica Agropecuaria y Ciencias del Medio



2025
Año de
La Mujer
Indígena

EL CENTRO DE BACHILLERATO TECNOLÓGICO AGROPECUARIO NO. 96
"DR. VALENTÍN GÓMEZ FARÍAS"

OTORGA LA PRESENTE **CONSTANCIA**

Por su participación en el Curso de Capacitación para productores:
Desarrollo Integral y Colaborativo para la Producción Porcina desde el
Enfoque de una Sola Salud.

A: QFB ROXANA PASTRANA UNZUETA
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA DE LA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

El cual se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Bachillerato
Tecnológico Agropecuario No. 96 "Dr. Valentín Gómez Farías", el día 17 de
octubre de 2025.

Se extiende la presente constancia en Xalatlaco, Estado de México



SEP
SEMS
DGETA, No. 96
C.B.T.A. No. 96
C.C.T. 1507AB
XALATLACO,
ESTADO DE MÉXICO

M.E. ALFONSO COLÍN GÓMEZ
DIRECTOR DEL CBTA 96



XLVIII ANIVERSARIO



**LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA Y EL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD**
Otorgan la presente constancia



**a:Pastrana Unzueta Roxana, Cerriteño Sánchez José L., Cuevas Romero Julieta
Sandra, Blancas Flores Gerardo.**

Por la Presentación del Trabajo en Cartel:

**“CONSTRUCCIÓN DE UN SISTEMA DE EXPRESIÓN RECOMBINANTE PARA LA PROTEÍNA N DEL
VIRUS SARS-COV2.”**

**En el XXX Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud
Celebrado del 29 al 31 de octubre del 2025**


Dr. Fernando Rivera Cabrera
Jefe del Departamento de Ciencias de la Salud

Comité Organizador: Dra. Adriana Alarcón Aguilar, Dra. Elsa Cervantes Ríos, Dra. Ofelia Limón Morales, Dra. Norma Edith López Díaz Guerrero,
Dra. Denise Raddatz Mota, Dra. Bárbara Vargas Miranda



Educación
Secretaría de Educación Pública

DGETAyCM



Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria y Ciencias del Mar
Brigada de Educación para el Desarrollo Rural No. 92

OTORGA LA PRESENTE :

CONSTANCIA

A LA QFB. ROXANA PASTRANA UNZUETA
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA, UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

Por su Ponencia:

“SITUACIÓN DE PPA EN LA REPÚBLICA DOMINICANA Y HAITÍ”

A productores de la Comunidad San Bartolo Oxtotitlán
Municipio de Jiquipilco Estado de México
el día 09 de diciembre del 2025

M. En C. Manuel Guerrero Bárcena
Subdirector No Académico de la BEDR No. 92





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

No. 00223

Matrícula: 2251800014

Clonación, expresión y evaluación antigénica de la proteína recombinante N del SARS CoV-2.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 23 del mes de marzo del año 2026 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. GERARDO BLANCAS FLORES
DR. JOSE LUIS CERRITEÑO SANCHEZ
DR. FRANCISCO JAVIER ALARCON AGUILAR

siendo los dos primeros asesores de la alumna y lector el tercero, de la Idónea Comunicación de Resultados, se reunieron a evaluar la presentación cuya denominación aparece al margen, para la obtención del diploma de:

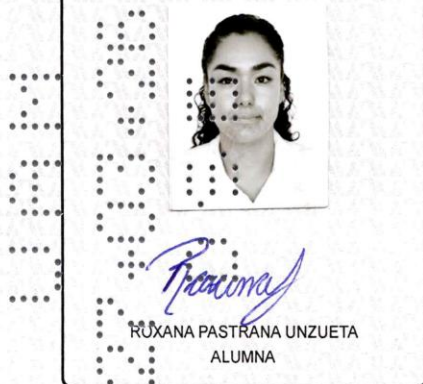
ESPECIALIZACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

DE: ROXANA PASTRANA UNZUETA

y de acuerdo con el artículo 79 fracción II del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, se comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



ROXANA PASTRANA UNZUETA
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH ARENAS RÍOS

ASESOR

DR. GERARDO BLANCAS FLORES

ASESOR

DR. JOSE LUIS CERRITEÑO SANCHEZ

LECTOR

DR. FRANCISCO JAVIER ALARCON AGUILAR