



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA – IZTAPALAPA

POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Evaluación inmunológica de un complejo inmunoestimulante a base de nanopartículas lipídicas con ácido glicirricínico (GA) acoplado a proteínas recombinantes de Coronavirus (*Alphacoronavirus* y *Betacoronavirus*)

TESIS

Que para obtener el grado de “Maestro en Biología Experimental”

PRESENTA:

B.E. José Bryan García Cambrón

Comité de tutores:

Dra. Julieta Sandra Cuevas Romero – Codirectora externa. CENID-SAI

Dr. Gerardo Blancas Flores – Codirector Interno. UAM-I

Dr. José Luis Cerriteño Sánchez – Asesor. CENID-SAI.

El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020

El proyecto fue apoyado con financiamiento de la beca SEP-CONACYT “Becas Nacionales para Estudios de Posgrado”, con número de beca: 802889, para el alumno José Bryan García Cambrón (CVU: 992190), y con apoyo del proyecto SEP-CONACYT 288942 "Estudio del Ácido Glicirricínico (18 β -ácido glicirricínico) incorporado en un complejo inmunoestimulante como potencial adyuvante de proteínas recombinantes".

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

“Evaluación inmunológica de un complejo inmunoestimulante a base de nanopartículas lipídicas con ácido glicirricínico (GA) acoplado a proteínas recombinantes de Coronavirus (*Alphacoronavirus* y *Betacoronavirus*) “, que presentó:

B. E. José Bryan García Cambrón

El día 11 de septiembre del año 2023

Sinodales (Nombre, adscripción y firma de cada uno):

Dr. Humberto González Márquez (Presidente)
Depto. de Ciencias de la Salud, UAM-I.

Dr. José Luis Cerriteño Sánchez (Secretario)
CENID-SAI.

Dr. Julio César Almanza Pérez (Vocal)
Depto. de Ciencias de la Salud, UAM-I.

Dr. Moisés Vergara Mendoza (Vocal)
Depto. de Ciencias de la Salud, UAM-I.

Comité de tutores

La Dra. Julieta Sandra Cuevas Romero es investigadora titular “C” del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI), por parte del INIFAP, y participó en el proyecto como responsable directo, además de generar recursos teóricos y materiales en el área de inmunología y virología, que fueron de completo interés en el proyecto. Contacto: cuevas.julieta@inifap.gob.mx

El Dr. Gerardo Blancas Flores es profesor-investigador titular en el departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud (CBS) de la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa (UAM-I), y participó en el proyecto como generador de materiales y reactivos para el desarrollo de las metodologías propuestas, además de proporcionar apoyo en el desarrollo de los recursos teóricos y metodológicos en el análisis de la expresión de citocinas. Contacto: gera@xanum.uam.mx

El Dr. José Luis Cerriteño Sánchez es investigador titular “C” del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI), por parte del INIFAP, y participó en el proyecto dirigiendo el desarrollo de los antígenos recombinantes (proteínas M y NTD-S de los coronavirus descritos), además de proveer apoyo teórico y técnico en el desarrollo de los complejos inmunoestimulantes. Contacto: cerriteno.jose@inifap.gob.mx

Dedicatorias y agradecimientos

A José Damián G.R., mi razón de seguir adelante.

A Evelyn R.R., por su incalculable e incondicional apoyo durante mi desarrollo profesional.

A mi padre, madre y hermanos, que siempre me motivaron a superarme.

A mis amigos de posgrado, Paola, Abigail, Alison y Genaro, que siempre nos apoyamos durante esta travesía llamada maestría.

A mis colegas de laboratorio, Eduardo, Carlos, Nadia y Sara, que hicieron la estadía en el laboratorio amena y divertida.

A la Dra. Sandra, que confió en mis capacidades y me brindó la oportunidad de trabajar en conjunto con ella.

Al Dr. Gerardo, que siempre me apoyó y coordinó en el transcurso del proyecto.

Al Dr. José Luis, que desde siempre me brindó su apoyo y consejo.

Un cordial agradecimiento al laboratorio de Virología II (Epizootiología) del CENID-SAI, donde se realizó el presente proyecto y donde, considero, es como un segundo hogar. Además, un agradecimiento a los y las docentes del posgrado en biología experimental de la UAM-I, así como al laboratorio de farmacología de la UAM-I, quienes con sus consejos y sugerencias se logró cumplir con el objetivo, lograr obtener un posgrado.

Resumen

Los coronavirus son un conjunto de virus que afectan tanto en la salud pública como en la salud veterinaria. Las enfermedades producidas por estos virus generan grandes estragos en la salud y en la economía. Las vacunas de nueva generación a base de subunidades (antígeno más adyuvante) generan una respuesta inmune fuerte y sirven como biológicos para la prevención y control de enfermedades infecciosas. En este trabajo se desarrolló un complejo inmunoestimulante usando nanopartículas lipídicas con ácido glicirricínico (LNPs-GA) acopladas con dos antígenos virales (proteína M y NTD-S recombinantes del SARS-CoV-2 y del VDEP, respectivamente) con potencial uso como vacuna. LNPs-GA fueron desarrolladas mediante el método de filme lipídico. Se obtuvieron los antígenos recombinantes rM (SARS-CoV-2) y rNTD-S (VDEP) en un sistema procarionte. Se evaluó el tamaño, la forma y estabilidad del complejo. Se determinó la capacidad inmunoestimulante humoral en ratones de la cepa CF-1, los cuales fueron inmunizados con el complejo vía subcutánea y se les extrajo muestras de sangre cada 7 días durante 35 días. Por otro lado, se determinó la respuesta inmune celular (expresión de citocinas) en suero mediante kits de ELISA. Los resultados mostraron que las LNPs-GA acopladas con los antígenos recombinantes rM y rNTD-S tienen un tamaño que oscilan entre los 60-200 nm y mostraban estabilidad (-27.6 mV). La evaluación de la respuesta humoral mostró que el complejo inmunoestimulante produce mayores niveles de anticuerpos con respecto al control, mientras que la evaluación de la respuesta celular mostró que las LNPs-GA modula la expresión en suero de dos citocinas de respuesta inflamatoria.

Abstract

Coronaviruses are a set of viruses that affect both public and veterinary health. Diseases caused by these viruses are devastating health and economic issues. New-generation vaccines based on subunits (antigen-adjuvant) generate robust immune responses and are biologics for preventing and controlling infectious diseases. In this study, an immunostimulant complex was developed using lipid nanoparticles with glycyrrhinic acid (LNPs-GA) coupled with two viral antigens (recombinant M protein of SARS-CoV-2 and NTD-S protein of VDEP) with potential use as a vaccine. LNPs-GA were developed using the lipid film method. Recombinant rM (SARS-CoV-2) and rNTD-S (VDEP) antigens were obtained using a prokaryotic system. The size, shape, and stability of these complexes were evaluated. Humoral immunostimulant capacity was determined in mice of the CF-1 strain, immunized with the complex subcutaneously, and blood samples were collected every seven days for 35 days. On the other hand, the cellular immune response (cytokine expression) in serum was determined by ELISA kits. The results showed that the LNPs-GA coupled with recombinant antigens rM and rNTD-S had a size ranging from 60-200 nm and showed stability (-27.6 mV). Evaluation of the humoral response indicated that the immunostimulant complex produces higher levels of antibodies than the control. In contrast, an assessment of the cellular response showed that the LNP-GA modulates the serum expression of two inflammatory response cytokines.

Abreviaturas

APCs: Antigen-Presenting Cells (células presentadoras de antígenos)

cDNA: Complementary DNA (ADN complementario)

COVID-19: Coronavirus disease – 19 (Enfermedad de coronavirus – 19)

CTD: C-Terminal Domain (dominio C-terminal)

VDEP: Virus de la Diarrea Epidémica Porcina

PEDV: Porcine Epidemic Diarrhea Virus

ERGIC: ER-Golgi Intermediate Compartment (compartimiento intermedio ER-Golgi)

GA: Glycyrrhetic Acid (ácido glicirricínico)

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

IL: Interleukin (interleucina)

IPTG: isopropil β -D-1-tiogalactopiranósido

LB: Luria Bertani

LNPs: Lipid Nanoparticles (nanopartículas lipídicas)

LNPs-GA: Lipid Nanoparticles based Glycyrrhetic Acid (nanopartículas lipídicas con ácido glicirricínico)

MERS-CoV: Coronavirus del Síndrome Respiratorio del Medio Oriente

NLR: Nod-like receptor (receptor tipo Nod)

NTD: N-Terminal Domain (dominio N-terminal)

ORF: Open Reading frame (marco abierto de lectura)

PAMPs: Pathogen-Associated Molecular Patterns (patrones moleculares asociados a patógenos)

PCR: Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)

PRR: Patterns Recognition Receptors (receptores de reconocimiento de patrones)

PRRS: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (síndrome reproductivo y respiratorio porcino)

RBD: Receptor-Binding Domain (Dominio de unión al receptor)

RLR: Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors (Receptores inducibles por ácido retinoico tipo I (RIG-I))

SARS-CoV-2: Coronavirus del Síndrome Respiratorio Severo Agudo – 2

TLR: Toll-Like Receptor (receptor tipo toll)

TNF: Tumor Necrosis Factor (factor de necrosis tumoral)

Índice General

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Coronavirus	3
2.1.1. VDEP y la enfermedad de la Diarrea Epidémica Porcina	4
2.1.1.1. Tratamiento y control contra el VDEP	5
2.1.1.2. Estructura genética, proteínas y su función del VDEP	6
2.1.1.3. Proteína spike o “espiga” (S)	7
2.1.1.3.1. Dominio amino terminal de la proteína S (NTD-S)	8
2.1.1.4. Ciclo viral en cerdos del VDEP	9
2.1.2. SARS-CoV-2 y la enfermedad de Coronavirus (COVID-19)	11
2.1.2.1. Tratamiento e inmunoterapia contra la COVID-19	12
2.1.2.2. Estructura genética, proteínas y su función del SARS-CoV-2	13
2.1.2.3. Proteína de membrana (M)	14
2.1.2.4. Ciclo viral en humanos del SARS-CoV-2	15
2.2. Vacunas	17
2.2.1. Tipos de vacunas	18
2.2.2. Vacunas de tipo recombinante	19
2.2.2.1. Proteínas recombinantes obtenidas de microorganismos	21
2.2.2.2. Adyuvantes o moduladores de la respuesta inmune	22
2.2.2.2.1. Ácido glicirricínico (GA) y su uso en adyuvantes	24
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. HIPÓTESIS	28
5. OBJETIVO	28

5.1. Objetivos específicos.....	28
6. MATERIAL Y MÉTODOS	29
6.1. Modelo del desarrollo experimental	29
6.2. Desarrollo de nanopartículas lipídicas con ácido glicirricínico (LNPs-GA).....	30
6.3. Clonación, expresión y purificación de biológicos recombinantes.....	31
6.3.1. Proteína de membrana recombinante (rM) del virus SARS-CoV-2.....	31
6.3.1.1. Amplificación del marco de lectura codificante del gen M.....	31
6.3.1.2. Clonación del gen M en el vector pJET1.2/blunt	32
6.3.1.3. Transformación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	32
6.3.1.4. Extracción y análisis del DNA plasmídico	34
6.3.1.5. Clonación del gen M en el vector de expresión pET-SUMO	34
6.3.1.6. Evaluación del inserto en el vector.....	35
6.3.1.7. Obtención de cepas sobreproductoras de la proteína recombinante...36	
6.3.1.8. Expresión de la rM en la cepa BL21/DE3	37
6.3.1.9. Expresión de proteína rM mediante Inmunodetección	38
6.3.2. Dominio N-terminal de la proteína S recombinante (rNTD-S) del virus VDEP	39
6.3.2.1. Obtención y solubilización de la proteína rNTD-S.....	39
6.3.2.2. Purificación de la proteína rNTD-S.....	41
6.4. Caracterización del complejo de LNPs-GA acopladas con la proteína recombinante.....	42
6.4.1. Evaluación del tamaño del complejo	42
6.4.2. Análisis morfológico de las nanopartículas	42
6.4.3. Análisis de estabilidad y carga de las partículas	43
6.5. Selección e inoculación de un modelo murino	43

6.5.1. Obtención de muestras de los ratones inoculados	44
6.6. Evaluación de la respuesta humoral mediante inmunoensayo	45
6.7. Determinación de la concentración de citocinas en suero	46
7. RESULTADOS.....	47
7.1. Desarrollo y obtención de proteínas recombinantes	47
7.1.1. Desarrollo de un sistema de expresión para la proteína rM del virus SARS-CoV-2	47
7.1.1.1. Amplificación y primera clonación del gen M	47
7.1.1.2. Subclonación del gen M en el vector de expresión	50
7.1.1.3. Expresión de la proteína rM	56
7.1.2. Expresión y purificación de la proteína rNTD-S.....	57
7.2. Evaluación de nanopartículas lipídicas	59
7.2.1. Obtención y evaluación del tamaño de las LNPs-GA.....	59
7.2.2. Análisis microscópico de las LPNs-GA.....	60
7.2.3. Evaluación de la estabilidad en dispersión (potencial Z)	61
7.3. Determinación de la respuesta humoral en el modelo murino	62
7.4. Evaluación de la concentración de citocinas en suero	65
8. DISCUSIÓN.....	68
9. CONCLUSIONES.....	71
10. REFERENCIAS	72
11. ANEXOS	86
11.1. Congresos presentados durante el desarrollo de este proyecto	86
11.2. Artículos publicados durante la maestría	88
11.3. Cronograma de desarrollo del proyecto	91

11.4.	Declaración de originalidad.....	92
-------	----------------------------------	----

1. INTRODUCCIÓN

Los Coronavirus tienen gran importancia en la actualidad debido a que han estado presente desde hace tiempo causando enfermedades entéricas y respiratorias en animales y humanos. Basado en sus capacidades de transmitirse y adaptarse para infectar muchas especies tanto humanos como animales de compañía, de granja, de laboratorio y silvestres, son considerados como virus con relevancia en materia de salud a nivel mundial (Rice *et al.*, 2021).

Los coronavirus han sido en los últimos años agentes causantes de enfermedades, que involucran agentes virales tales como los virus OC43 (Hasöksüz *et al.*, 2020), TEGV y VDEP (Yan *et al.*, 2022), HKU1 (Chen *et al.*, 2018), SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2 (Rabaan *et al.*, 2020) que han sido de los más representativos debido al impacto que han dejado (salud y economía) entre humanos y animales, y a que constantemente se dan brotes y rebrotes de variantes con mayor efectividad (Tang *et al.*, 2022).

Actualmente, la producción de cerdos en México, al menos en el 2019, fue superior a 18.6 millones de cerdos, lo que dio un alcance de exportación de 212 mil toneladas (Secretaría de Agricultura y Desarrollo [SADER], 2020). Sin embargo, las enfermedades producidas por coronavirus impactan entre el 20% y 30% de la producción, generando grandes pérdidas económicas (Organización Mundial de la Salud Animal [OIE], 2014). Además, ante la actual pandemia por el coronavirus SARS-CoV-2, el consumo de carne de cerdo disminuyó de manera considerable (hasta el 40%) (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura [IICA], 2020). Esto,

junto con los constantes rebrotes de infección en las granjas de los principales estados productores de cerdos, genera un impacto económico en el sector porcícola (García-González *et al.*, 2023).

En cuanto a la economía social, las infecciones por estos virus causan grandes pérdidas económicas. Tan solo en la pandemia más reciente, los cierres de fronteras entre países, cierres turísticos y de ventas de alimentos generaron pérdidas de hasta el 70%, al menos en México, incrementando en el desempleo formal (Esquivel, 2020).

A partir de la pandemia de COVID-19, la carrera en el desarrollo de vacunas contra los coronavirus se volvió de gran interés, enfocándose principalmente en el desarrollo de vacunas de nueva generación (Pollet *et al.*, 2021), con lo cual se buscaría disminuir los nuevos brotes, rebrotes y las posibles zoonosis con otros coronavirus. Recientemente se ha observado que el modelo de vacunas a base de subunidades generan una respuesta inmune eficiente, duradera y con efectos reactogénicos bajos. La efectividad de estas vacunas es resultado de la selección de un buen antígeno y de un adyuvante eficiente. Las proteínas estructurales de coronavirus han resultado ser buenos antígenos para el desarrollo de biológicos terapéuticos (Mistry *et al.*, 2022). Por otro lado, las nanopartículas lipídicas han sido de reciente interés y uso en el desarrollo de vacunas contra SARS-CoV-2 y otros virus (Abdellatif *et al.*, 2023). En conjunto, estos componentes pueden generar modelos terapéuticos para prevenir y controlar las afecciones por coronavirus.

2. ANTECEDENTES

2.1. Coronavirus

La familia *Coronaviridae* está compuesta por virus envueltos complejos que contienen una gran cadena de RNA de polaridad positiva, y un arreglo proteínico externo en forma de corona, aspecto que les otorgó el nombre (Imagen 1). Estos virus fueron identificados por primera vez en los 60's en aves de corral enfermas, cerdos y terneras. Mediante estudios de serología y filogenia, los coronavirus se dividieron en 4 géneros, designados como: Alpha-, Beta-, Delta- y Gamma-coronavirus (Rajcani, 2020). Los coronavirus más representativos son los pertenecientes a los géneros Alpha- y Beta-coronavirus, debido a que afectan a un gran número de especies animales, principalmente a los cerdos, además de que incluyen a coronavirus que afectan a humanos como, por ejemplo, el Beta-coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS) (Colina *et al.*, 2021).

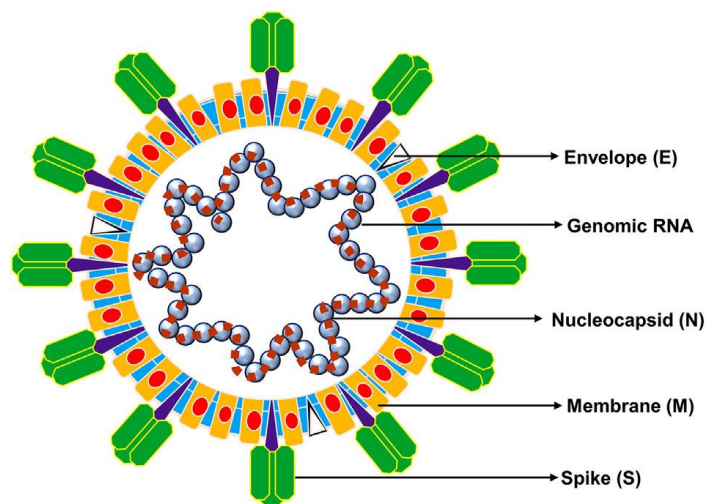


Imagen 1. Estructura típica de un Coronavirus, con un diámetro que oscila entre 80-120 nm, y que está conformado por las proteínas estructurales S, M y E, que cubren el genoma viral, el cual es protegido y compactado por la proteína N (tomado de: Kirtipal *et al.*, 2020).

2.1.1. VDEP y la enfermedad de la Diarrea Epidémica Porcina

En 1971, se identificó a un coronavirus causante de una enfermedad con signos muy parecidos a la enfermedad ocasionada por el coronavirus de la gastroenteritis transmisible en cerdos (TEGV), y el cual más tarde, en 1977, sería nombrado virus de la diarrea epidémica porcina (VDEP) (Colina *et al.*, 2021). Este virus causa una enfermedad muy contagiosa, ya que tiene una distribución amplia en muchas áreas geográficas en el ámbito mundial y una gran propagación en porcinos (Piñeros *et al.*, 2015). La enfermedad es generalmente severa, a menudo letal en cerdos neonatales, y dentro de los signos clínicos más destacables incluyen diarrea y vómito, lo que propicia a deshidratación severa, pérdida significativa de peso, letargia y, finalmente, la muerte (Wang *et al.*, 2019).

2.1.1.1. Tratamiento y control contra el VDEP

Actualmente no existe un tratamiento específico contra VDEP y su enfermedad que no sea el tratamiento sintomático de la diarrea y las infecciones secundarias que se provocan. Cabe mencionar que el mejoramiento de la bioseguridad es el mejor remedio para prevenir la introducción del virus. Sin embargo, muchos países suelen introducir vacunas con el fin de generar una mejor respuesta inmune, aunque por lo general, ésta disminuye rápidamente y suele generar reinfecciones (Jung *et al.*, 2020). Las vacunas que se suelen aplicar contienen virus atenuados, aunque suelen presentar inactivación de inmunidad y por lo tanto requieren de más dosis. Por otro lado, las vacunas con subunidades virales tienen más ventajas, como que incluyen mayor seguridad, no propagación de ácidos nucleicos y la incorporación de antígenos bien definidos, los cuales son acompañados de un adyuvante para potenciar la inmunogenicidad (Li *et al.*, 2020). Actualmente el desarrollo de estos biológicos predomina en el continente asiático, donde se dan rebrotes de infección por VDEP constantes, sin embargo, existen empresas en USA (como Zoetis) que producen vacunas (con base en vectores con genes de la proteína S) para ser aplicadas en campo (Li *et al.*, 2016).

2.1.1.2. Estructura genética, proteínas y su función del VDEP

VDEP es un virus envuelto, pleomórfico de 95-190 nm de diámetro, que cuenta con un genoma de RNA positivo de una sola cadena de aproximadamente 28 kb, que codifica para cuatro proteínas estructurales, llamadas S (spike o espiga), E (envoltura), M (membrana), N (nucleocápside), y 16 proteínas no estructurales (nsp1-nsp16), además de una proteína accesoria (ORF3) (Imagen 2) (Jung *et al.*, 2020).

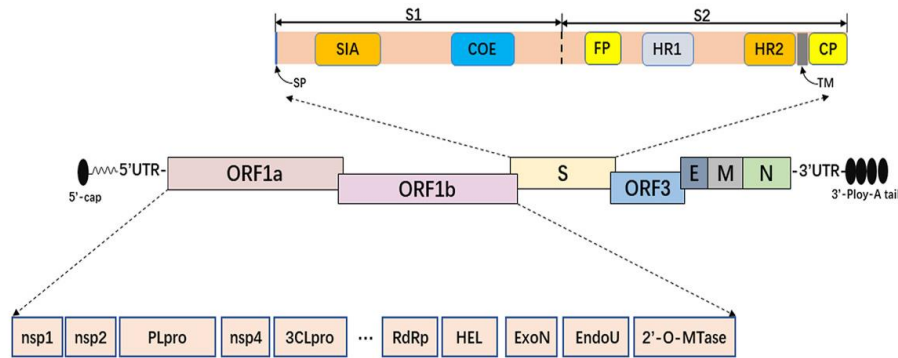


Imagen 2. Estructura genética del VDEP (imagen tomada y modificada de: Li *et al.*, 2020).

Dentro del conjunto de proteínas que conforman al virus, las proteínas no estructurales (Nsp) son consideradas como el factor de virulencia principal de los Coronavirus, las que juegan roles desde la inhibición o supresión de genes hospederos y la evasión de la respuesta inmune innata, con el fin de facilitar la replicación viral (Li *et al.*, 2020). Las proteínas estructurales forman parte de la conformación viral y el vínculo principal entre el genoma viral y la célula hospedera. La glicoproteína S es la más importante debido a su rol principal que es mediar la entrada viral a la célula y es responsable de la virulencia *in vivo*, aunque puede inducir anticuerpos neutralizantes (Chen *et al.*,

2018). La proteína N es una proteína abundante, se une al RNA viral y lo empaqueta como nucleocápside. La proteína M y E son proteínas de membrana que favorecen el ensamblaje y construcción de los viriones, además de que juegan otros roles en la activación de la respuesta inmune (Li *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2019). La proteína accesoria, ORF3, tiene actividad en formar canales de paso de iones, además que regula la replicación viral y la virulencia (Wang *et al.*, 2011).

2.1.1.3. Proteína spike o “espiga” (S)

La glicoproteína de tipo I espiga (S), es la responsable de la entrada del virus a la célula blanco. En forma de trímero en la superficie del virus, media funciones esenciales de unión al receptor y la subsecuente fusión de las membranas durante su entrada a la célula (Li *et al.*, 2016). Basado en análisis de homología entre los coronavirus, esta proteína se puede dividir en dos: una porción S1 y una S2 (Imagen 3).

Varios estudios muestran que el segmento S1 es el segmento más importante ya que es responsable del reconocimiento del receptor de superficie celular, mediante el cual se lleva una reacción de proteólisis que permite la fusión de membrana (mediado posteriormente por el segmento S2), la formación de sincitios y la entrada del virus, siendo el factor de infectividad más importante del virus (Norman *et al.*, 2021; Hu *et al.*, 2021). Este segmento está comprendido por dos sitios activos de reconocimiento a la superficie celular: un dominio amino terminal (NTD) y un dominio carboxilo terminal (CTD).

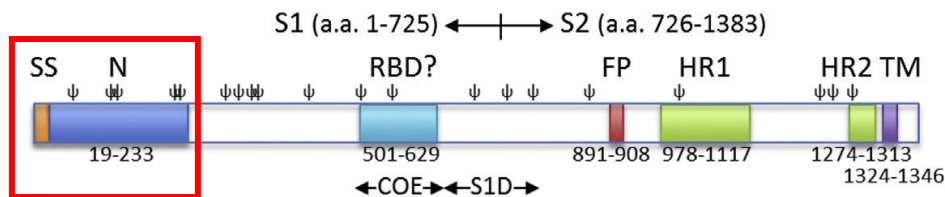


Imagen 3. Segmento de la proteína S, donde se resalta los fragmentos más importantes de la proteína. En el cuadro rojo se puede observar el segmento NTD.

2.1.1.3.1. Dominio amino terminal de la proteína S (NTD-S)

El segmento NTD-S tiene una porción de 214 residuos de aminoácidos, posicionándose desde el residuo 19 al 233 de la proteína S, (Imagen 3). Esta porción no contiene el segmento RBD (dominio de unión al receptor) (Li *et al.*, 2016).

Se ha demostrado que, dentro de toda la secuencia de la proteína S, el segmento NTD es el que más mutaciones ha presentado en los aislados en granjas de cerdos infectados con VDEP (Li *et al.*, 2011). Sin embargo, para un gran número de Alpha-coronavirus, la pérdida del NTD en la proteína S se correlaciona con la pérdida del tropismo entérico (Li *et al.*, 2016). Varios artículos indican que el segmento NTD puede interactuar con el co-receptor ácido 5-N-acetilneuraminico (ácido siálico), y la delección de este segmento demostró que VDEP tiene como blanco las células epiteliales y glándulas del tracto respiratorio, células del tracto biliar y algunos monocitos/macrófagos (Hu *et al.*, 2021). Esto indica que el segmento NTD determina la invasión, liberación, tropismo tisular y los mecanismos de transmisión entre especies susceptibles, además que es considerado como un blanco en el desarrollo de vacunas.

Su uso potencial también ha sido de interés para el desarrollo de pruebas de detección oportuna, así como de estudios de prevalencia del virus en granjas de la república mexicana (García-González *et al.*, 2023).

2.1.1.4. Ciclo viral en cerdos del VDEP

Como se mencionó, el virus es muy contagioso en cerdos, teniendo dos vías de infección: una directa y otra indirecta. La vía de infección directa está ligada principalmente por residuos fecales de los cerdos infectados, que entran en contacto vía oral con los cerdos sanos, infectándolos. El resto de las infecciones son por vía indirecta, mediante fómites, transporte en malas condiciones, baja bioseguridad en granjas, vías de aerosol entre animales-empleados, por alimento contaminado, etc. (Jung *et al.*, 2020). Cuando el virus ingresa vía oral o nasal, entra en contacto con el epitelio intestinal, particularmente en la sección media entre el yeyuno y duodeno, llevándose a cabo el reconocimiento de la aminopeptidasa N porcina (pAPN) por la proteína S, siendo este el factor de tropismo celular (Lee, 2015). En este punto, la proteína S sufre un corte proteolítico que le permite la fusión de la membrana celular y el virus, llevando la entrada del genoma viral a la célula. Al igual que otros coronavirus, su genoma es reconocido como mRNA, por lo que es traducido por la maquinaria traduccional celular para generar las proteínas pp1a y pp2ab, las que servirán para generar progenies de RNA genómico y RNA subgenómico (Liu & Gerdt, 2019). Del RNA subgenómico se obtiene la proteína N, la cual junto al RNA genómico forma la nucleocápside, que se forma en el compartimiento intermedio ER-Golgi

(ERGIC), donde se integrarán las proteínas S, M, E y ORF3 para formar los viriones que serán liberados por exocitosis (Imagen 4) (Lv *et al.*, 2016).

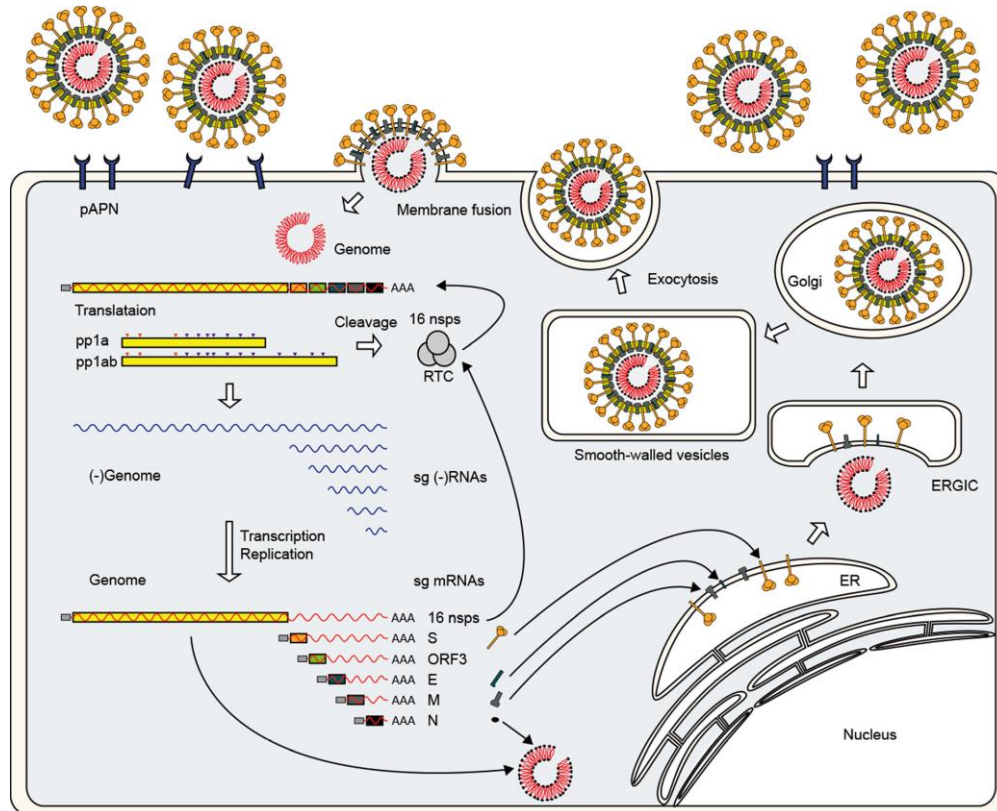


Imagen 4. Ciclo viral del VDEP. El reconocimiento e interacción célula-virus se realiza a partir de la unión pAPN y la proteína S. Una vez ingresado el genoma viral, este es traducido para dar presencia a las proteínas pp1a y pp2ab, las cuales formarán los posteriores RNA genómicos y subgenómicos (que posteriormente darán lugar a las proteínas estructurales). El ensamblaje de los viriones ocurrirá en el ERGIC, donde posteriormente serán liberados mediante exocitosis para seguir infectando células (imagen tomada y editada de: Lee, 2015).

2.1.2. SARS-CoV-2 y la enfermedad de Coronavirus (COVID-19)

En diciembre del 2019 en Wuhan, China, fue identificado un individuo masculino con signos y síntomas parecidos a una neumonía. Se identificó en el mismo año que el agente causante de dicha afección era un coronavirus y fue hasta el siguiente año que se le denominó y clasificó como virus del Síndrome Respiratorio Severo Agudo 2 (SARS-CoV-2), un Beta-coronavirus, debido a la gran homología genética que tiene con el virus SARS-CoV (Rabaan *et al.*, 2020). SARS-CoV-2 generó la pandemia denominada COVID-19 desde febrero del 2020, con un rango de transmisión de 3-4 personas y una tasa de mortalidad, al menos en México, de 38.2% entre el año 2020-2021 (Palacio-Mejía *et al.*, 2022). La vía de transmisión principal del virus es por aerosol (partículas de secreciones nasofaríngeas dispersas en el aire), y una vez infectado el organismo, el virus se mantiene en incubación durante 7-14 días. Durante este tiempo, el infectado puede o no manifestar signos y síntomas asociados, tales como escurrimiento nasal, fiebre, tos seca o con flemas, fatiga, neumonía, estrés respiratorio (disminución de oxigenación), en algunos casos diarrea, los cuales se pueden agravar si el individuo presenta comorbilidades, principalmente hipertensión, diabetes y problemas cardíacos (Peng, 2020).

2.1.2.1. Tratamiento e inmunoterapia contra la COVID-19

A partir de la pandemia actual, se comenzó con la carrera en el desarrollo y uso de herramientas para mitigar o controlar las enfermedades ocasionadas por agentes virales. Una de las más típicas son las vacunas. Las vacunas contra SARS-CoV-2 se desarrollan usando virus completos, partes del virus, fragmentos de origen recombinante o vectores que portan un fragmento genómico del virus (Yadav *et al.*, 2020), por ejemplo, la vacuna basada en mRNA viral, desarrollada por Moderna, o la vacuna desarrollada por Novavax que usa la proteína S recombinante junto con un adyuvante de tipo liposomal (Chung *et al.*, 2021). Finalmente, el objetivo es estimular una respuesta inmune eficaz, capaz de reducir y proteger de los estragos ocasionados por la infección viral. Junto con esto, también se han desarrollado moléculas que cumplen el objetivo de inhibir la proliferación viral. Tal es el caso de Remdesivir, un análogo de adenosina que inhibe la RbRp viral, evitando la propagación del genoma viral (Wang *et al.*, 2020). También se han desarrollado tratamientos utilizando anticuerpos neutralizantes purificados provenientes de sueros de pacientes convalecientes a la infección por SARS-CoV-2, y han sido aprobados y reconocidos por la FDA (Food and Drug Administration) como un tratamiento seguro y eficaz (Batista & Foti, 2021).

2.1.2.2. Estructura genética, proteínas y su función del SARS-CoV-2

Al igual que el resto de los Coronavirus, el Beta-coronavirus SARS-CoV-2 es un virus envuelto que poseen un genoma de una sola cadena de RNA de aproximadamente 27-32 kb, en sentido positivo (Imagen 5), que de esta forma le permite ser reconocido como un mRNA una vez dentro de la célula infectada (Artika *et al.*, 2020).

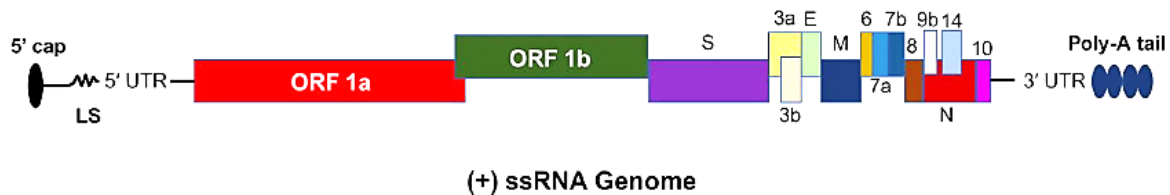


Imagen 5. Representación de la secuencia genética del SARS-CoV-2, la cual consta de características que le permiten ser identificada como un mRNA (5' Cap y cola poli-A 3') (imagen tomada y modificada de: Naqvi *et al.*, 2020).

Estructuralmente, el virus consta de una nucleoproteína (N) que forma la cápside interna, propiciando al empaquetamiento del genoma viral, el cual a su vez es empaquetado por la asociación de otras 3 proteínas estructurales: la proteína de membrana (M), la proteína de envoltura (E) y la proteína espiga (S), el cual dicho arreglo resulta en un virus con la típica característica de corona (Wang *et al.*, 2020). Al igual que su homólogo VDEP, SARS-CoV-2 también incluye 16 proteínas no estructurales (Nsp1-16), las cuales están involucradas en el procesamiento del genoma viral, modulación de vías de señalización en la célula hospedera, modulación

de las membranas del retículo endoplásmico, la presencia de una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp), modulación de procesos de replicación y transcripción, entre otras funciones que garantizan la proliferación de las partículas virales, necesarias para la formación de viriones. Cabe mencionar que, en comparación del virus VDEP, SARS-CoV-2 no cuenta con una proteína accesoria (Artika *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020).

2.1.2.3. Proteína de membrana (M)

La proteína M es uno de los componentes más importantes en el virus debido a que juega un rol en el ensamblaje de los viriones, particularmente en su forma y tamaño, además que permite el correcto ensamblaje de otras proteínas estructurales, tales como la proteína S, E y N (Mahtarin *et al.*, 2020). La proteína cuenta con aproximadamente 222 residuos de aminoácidos, los cuales conforman una proteína glicosilada con 3 dominios membranales, esenciales para el ensamblaje de las partículas virales (Fu *et al.*, 2021). Varios análisis comparativos muestran que la proteína M es una de las proteínas más conservadas entre los Beta-coronavirus y, particularmente, entre las variantes de SARS-CoV-2 (98% de identidad) (Bianchi *et al.*, 2020). En este mismo sentido, se han hecho comparaciones entre proteínas M de los Beta-coronavirus que más impacto han generado en humanos (SARS-CoV-2, SARS-CoV y MERS-CoV) y se ha demostrado que la proteína M de SARS-CoV-2 presenta 2 regiones muy antigénicas en el extremo carboxilo terminal que le permiten tener mayor reconocimiento en superficies celulares comparado con sus homólogos virales (Alharbi *et al.*, 2021). Inmunoensayos usando regiones antigénicas recombinantes de la

proteína M muestran que produce respuestas humorales y celulares, además de que produce títulos de anticuerpos altos, tanto IgM como IgG, en pacientes convalecientes, detecciones realizadas aún después de 10 días posteriores de su recuperación (95% de reconocimiento) (Lopandić *et al.*, 2021). Por los aspectos anteriores, esta proteína sigue siendo considerada como un inmunógeno potencial.

2.1.2.4. Ciclo viral en humanos del SARS-CoV-2

Como se mencionó al inicio, la infección por SARS-CoV-2 en humanos se da por contacto de menos de 3 metros de distancia a través de transmisión nosocomial. Una vez dentro del organismo, el primer paso de la infección viral es la unión del virus con los receptores de las células hospederas, particularmente, la interacción de la glicoproteína S, a través del dominio de unión al receptor (RBD), con células que portan el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) (Hartenian *et al.*, 2020). La unión permite generar una reacción de proteólisis entre la porción S1 y S2, activando esta última, permitiendo la invaginación del virus en la membrana celular (Naqvi *et al.*, 2020). Una vez incorporado en la célula, el genoma es reconocido como un mensajero y es traducido por la maquinaria de traducción de la célula, permitiendo obtener las proteínas no estructurales que participarán en la formación del complejo RdRp (RNA polimerasa dependiente de RNA), con lo que se obtendrán subgenomas en sentido negativo y mRNAs subgenómicos que permitirán la formación de más genomas completos positivos y la traducción de las proteínas estructurales (Kirtipal *et al.*, 2020). Los genomas completos positivos son unidos por la proteína N y anclados al ERGIC, en donde las proteínas M, E y S se posicionan de tal manera que conforman

lo que resultará en la cápside viral. Una vez hecho esto, el virión envuelto será exportado fuera de la célula por exocitosis (Satarker *et al.*, 2020; Kirtipal *et al.*, 2020) (Imagen 6).

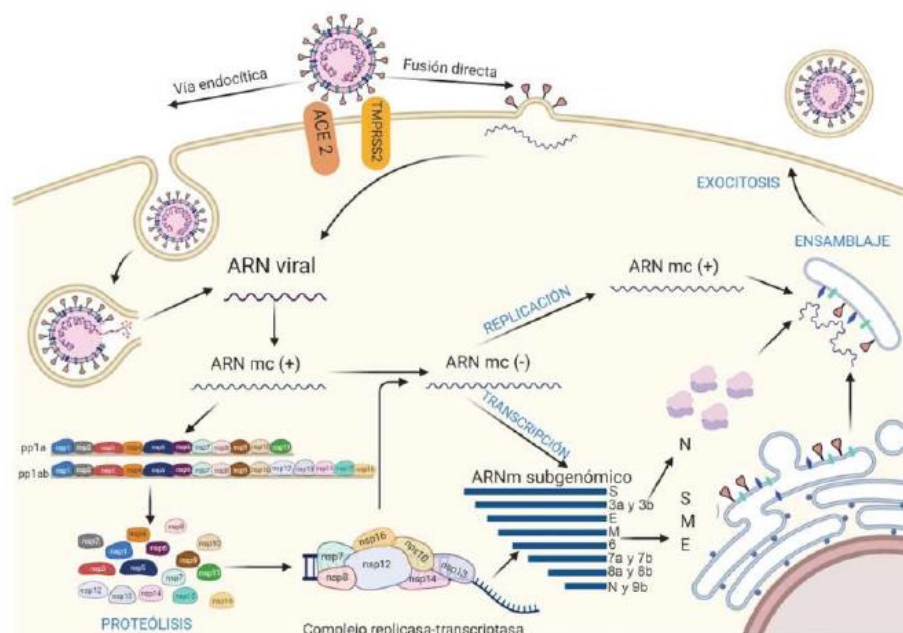


Imagen 6. Mecanismos de entrada y patogénesis del SARS-CoV-2. La vía de entrada del virus puede ser de 2 maneras: por endocitosis y por fusión directa, las cuales dependen de la interacción con el segmento RBD viral y el receptor ACE2. Su ingreso permitirá la traducción del RNA viral para llevar a cabo la producción de más material genético, a través del complejo RbRp, y la expresión de las proteínas estructurales responsables en el empaquetamiento del genoma, así como también la formación y liberación de viriones mediante exocitosis (imagen tomada y modificada de: Lam-Cabanillas *et al.*, 2021).

2.2. Vacunas

Una vacuna es una suspensión de microorganismos, o virus, que pueden estar atenuados, inactivos, tener fragmentos o productos derivados de ellos, la que se administra a un organismo (ya sea de manera independiente o con algún adyuvante) para producir una respuesta de tipo inmune, con el objetivo de generar protección frente a contactos posteriores con el agente del que se ha vacunado (Martínez-Mateo *et al.*, 2012).

La vacunación ha sido parte de la cultura ancestral desde la antigua China, donde los conocimientos empíricos han ido pasando entre generaciones hasta llegar a los impulsores de este fenómeno, entre los que se destaca a Edward Jenner, con su vacuna con la viruela vacuna, o Louis Pasteur, con su vacuna de virus atenuados de la rabia, así llegando hasta la actualidad, donde la tecnología y los métodos de manipulación genética han permitido tener una variedad amplia de biológicos que pueden prevenir muchas infecciones. Cabe mencionar que Jenner y Pasteur también son dos ejemplos de la introducción de las vacunas en animales (Quezada, 2019). En la aplicación de vacunas, la búsqueda de la inmunogenicidad es el objetivo principal, y esto depende de 3 factores: características propias del antígeno (filogenia, patrones de modificación, contaminantes, etc.), aspectos intrínsecos del huésped (genéticos, infecciones concomitantes, etc.) y relativos a la administración (dosis, ruta de administración, duración de efectos, intervalo de dosis, etc.) (López-Hoyos *et al.*, 2003).

2.2.1. Tipos de vacunas

El tipo de vacunas varía principalmente del tipo de antígeno que se está incorporando. Los primeros tipos de vacunas fueron a base de patógenos atenuados, las cuales se les disminuía la concentración biológica y medio activo para generar una infección menor que permitiera producir la respuesta inmune esperada (Miguel-Hernández *et al.*, 2012). Actualmente su atenuación se debe a procesos físicos, químicos o por modificaciones genéticas, disminuyendo su patogenicidad, pero manteniendo la capacidad inmunoestimulante (Liu *et al.*, 2021). Con el desarrollo biotecnológico, se pudieron obtener vacunas con base en moléculas propias del patógeno o de origen recombinante (principalmente proteínas), las cuales se benefician por aumentar la seguridad de la vacuna. Sin embargo, muchos de estos biológicos no generan una respuesta inmune fuerte, por lo que suele incorporarse un adyuvante para potenciar el efecto del inmunógeno (Payne, 2017). En la pandemia actual, se implementaron modelos mejorados de vacunas. Las vacunas basadas en vectores implementan la capacidad de transportar genes que producen proteínas muy antigénicas cuando se incorporan en el organismo, y se han caracterizado por ser seguras y eficaces al momento de generar una respuesta inmune específica (Ura *et al.*, 2014). Otro modelo son las vacunas basadas en partículas tipo virus (VLPs), preparaciones supramoleculares multiproteínicas que generan respuestas específicas equivalentes a las de un virus, las cuales han sido implementadas como candidatos a vacunas contra la COVID-19 (Yadav *et al.*, 2019).

2.2.2. Vacunas de tipo recombinante

Las vacunas de tipo recombinante, también conocidas como vacunas de subunidades antigénicas, surgen a través de la implementación de modificar el ADN y de la capacidad de obtener antígenos que provocan inmunidad y una capacidad protectora eficaz para prevenir una enfermedad (Burnette, 1991). Si bien estos antígenos tienen la capacidad de generar una reacción inmunogénica, lo cierto es que muchos antígenos no logran una reactividad adecuada, por lo que en la formulación de vacunas se suele acoplar el antígeno con moléculas transportadoras o acarreadores (adyuvantes) que mejoran o impulsan la respuesta inmune comparado con el antígeno por sí solo (Imagen 7) (Dingermann, 2007). Actualmente existen métodos distintos para el desarrollo de vacunas recombinantes, entre los cuales están: síntesis de péptidos (método que consiste en el desarrollo de péptidos químicamente sintetizados que contienen epítomos relevantes acoplados a acarreadores), por microorganismos (para la obtención de proteínas recombinantes a través de bacterias o levaduras), cultivos celulares (el más usado por las farmacéuticas debido a que se obtienen proteínas con características cercanas a una estructura nativa o con modificaciones), y plantas transgénicas (uno de los modelos menos usados para obtener proteínas debido a las modificaciones exclusivas en plantas) (Soler *et al.*, 2007; Dingermann, 2007).

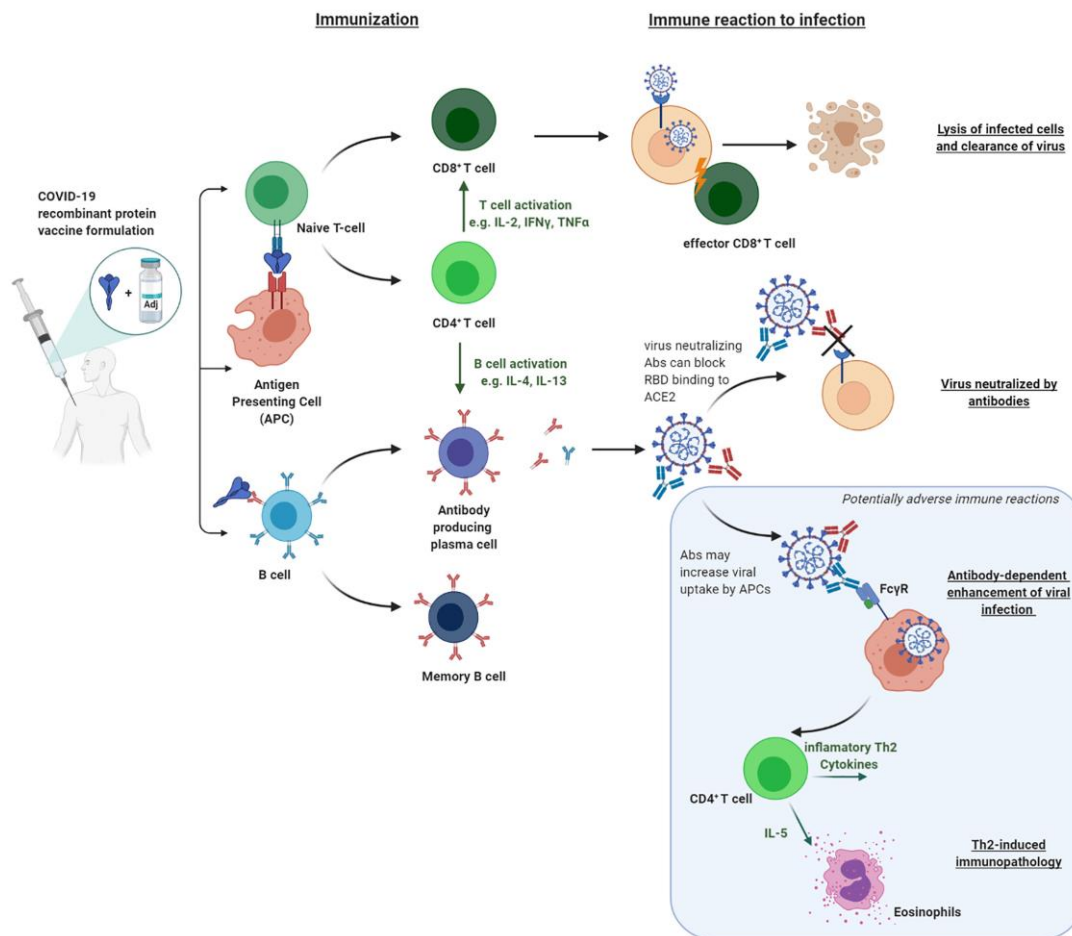


Imagen 7. Ejemplo del esquema general de la reacción inmunogénica usando una vacuna recombinante contra COVID-19. La aplicación de la vacuna puede desencadenar la formación y presencia de receptores celulares específicos e inducir una respuesta inmune innata desde el sitio de inyección. Esta respuesta a su vez induce al sistema inmune adaptativo por movilización de células presentadoras de antígenos (APCs), mejorando la presentación de antígenos a las células T cooperadoras CD4⁺. Dependiendo del fenotipo, las células T pueden estimular la proliferación específica de anticuerpos por células B o a las células T CD8⁺ efectoras (imagen tomada de: Pollet *et al.*, 2021).

2.2.2.1. Proteínas recombinantes obtenidas de microorganismos

La ingeniería genética permite obtener proteínas de organismos con un uso terapéutico potencial y en cantidades elevadas. El uso de microorganismos, tales como bacterias o levaduras, permite la producción de proteínas recombinantes de manera dinámica y con posibilidad de escalamiento. El sistema de expresión más empleado es el de *E. coli* (alrededor del 30% de las proteínas recombinantes de uso terapéutico son producidas en este sistema de expresión), y esto se debe a que presenta una serie de ventajas. En primer lugar, el genoma de esta procarionte se conoce hace ya varios años; en segundo lugar, se conoce su fisiología y metabolismo; en tercer lugar, existe una amplia gama de vectores bien establecidos para la producción de recombinantes y, por último, es de fácil crecimiento en medios muy simples (Lara, 2011). Para llevar a cabo esto, es necesario, primero, transformar al microorganismo mediante la incorporación de material genético heterólogo de interés (clonado en un vector de expresión), a través de métodos de transformación genética (mediante choque térmico, por ejemplo). Posteriormente, es necesario inducir la expresión del gen mediante inductores (lactosa o IPTG si el vector contiene el operón *lac*), de tal manera que se produzca la proteína de interés (mediante fermentación o extracción), se solubilice para recuperar una conformación cercana a la estructura nativa y su purificación para su uso terapéutico (Overton, 2014; García *et al.*, 2013) (Imagen 8).



Imagen 8. Esquema general del proceso de producción de proteínas recombinantes en *E. coli*. (imagen tomada de: <https://lifescience.biomedal.com/servicios/expresion-y-purificacion-de-proteinas-recombinantes>).

2.2.2.2. Adyuvantes o moduladores de la respuesta inmune

Los adyuvantes son componentes críticos en el desarrollo de vacunas recombinantes o vacunas de subunidades efectivas, ya que son incorporados en las vacunas blanco contra patógenos para propiciar el reconocimiento del antígeno por el sistema inmune, a través de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), que incluyen los receptores tipo Toll (TLR), receptores de proteínas de oligomerización de unión a nucleótidos (NLR) y los receptores del gen-I inducible por ácido retinóico (RLR) (Reed *et al.*, 2020). Con el continuo desarrollo de la nanotecnología, ha sido posible generar nuevos adyuvantes con la actividad requerida y con mayor seguridad. Actualmente, los adyuvantes se pueden clasificar en dos categorías: moléculas inmunoestimuladoras, que interactúan con receptores específicos para estimular una respuesta inmune, y los sistemas de entrega, los cuales no solo protegen al antígeno de la degradación sino, además, potencian la respuesta inmune de forma adhesiva a

nivel celular o tisular, capaces de abrir uniones estrechas entre células del sistema porta y promover el transporte de antígenos por vías alternas efectivas en la estimulación de inmunidad (Jin *et al.*, 2019). Los adyuvantes o nanopartículas de naturaleza lipídica han sido de los sistemas de entrega más empleados actualmente en las vacunas. Su naturaleza basada en lípidos, como colesterol, fosfolípidos, ácidos grasos modificados, saponinas, etc., o la combinación entre estos, les permite tener una versatilidad en su desarrollo, interacción y contacto con el organismo al que se va a incorporar. Debido a su conformación, estas partículas varían en cuanto a número de capas, cambios superficiales, polaridad, fluidez, que depende principalmente de su conformación, y esto repercute, por lo tanto, en la interacción con el antígeno, el cual puede ser transportado de manera superficial o puede ser encapsulado (Imagen 9) (Tsakiri *et al.*, 2021; Jin *et al.*, 2019). Distintos estudios indican que el tamaño de las partículas impacta en la actividad biológica, debido a que la complejidad de la estructura del adyuvante le permite tener mayor grado de interacción en la superficie celular y portar mayor concentración de antígeno (Shah *et al.*, 2014).

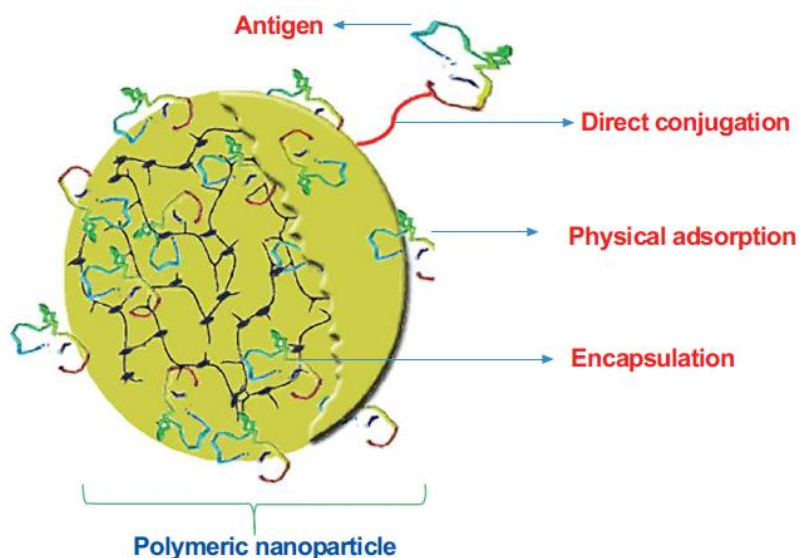


Imagen 9. Modelo de interacción entre la nanopartícula lipídicas y el antígeno (imagen tomada de: Kheirollahpour *et al.*, 2020).

2.2.2.2.1. Ácido glicirricínico (GA) y su uso en adyuvantes

En el desarrollo de adyuvantes de tipo lipídicos, algunos de estos están compuestos por saponinas, las cuales representan un papel importante en la interacción entre la nanopartícula lipídicas y el antígeno. El GA, un componente bioactivo obtenido de la raíz de la planta Licorisa (*Glycyrrhiza glabra*), es una molécula anfifílica, que representa un segmento hidrofílico compuesto por dos ácidos glucurónicos, y una parte hidrofílica, compuesta por el residuo del ácido glycyrrhetico (Imagen 10), y que ha sido ampliamente usada en la vieja China, Egipto y Japón (Pastorino *et al.*, 2018). Existen múltiples trabajos asociados que demuestran sus capacidades o su actividad biológica (antiviral, anticancerígeno, antimicrobiano, etc.), sin embargo, hay muy pocos trabajos enfocados en el desarrollo y aplicación del GA como acarreador (Selyutina et

al., 2019). Debido a que se comporta como una saponina (por su naturaleza anfifílica), su forma monomérica a pH 7 aún en concentraciones de hasta 12 mM, y tomando en cuenta las características estructurales (donde sus dos partes pueden formar asociaciones con moléculas de la misma naturaleza), le ha permitido ser usado como un blanco en el desarrollo de adyuvantes acarreadores (Matsuoka *et al.*, 2016; Selyutina *et al.*, 2019). Existen estudios que demuestran que el acoplamiento del GA en nanopartículas lipídicas permite generar una respuesta inmune potenciada. Zhao y colaboradores (2011) desarrollaron una formulación de nanopartículas lipídicas con GA acoplados con un antígeno del virus de la enfermedad de Newcastle, y obtuvieron resultados que indicaban que no solo la formulación generaba un incremento de títulos de anticuerpos sino, además, un incremento en subpoblaciones de linfocitos (CD4+ y CD8+), esto en comparación con los tratamientos controles. Otro reciente ensayo (Urban-Morlán, 2015), esta vez usando micelas de GA, mostraron que, interesantemente, el GA no solo mostró su capacidad antiviral disminuyendo títulos virales en cultivos celulares infectados por el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS), sino que también tenía capacidades antioxidantes, otorgando mayor resistencia a las células infectadas y disminuyendo la muerte celular del cultivo, aspecto característico de la infección por PRRSV. Estos y otros trabajos relacionados muestran que el GA es un buen acarreador de antígenos.

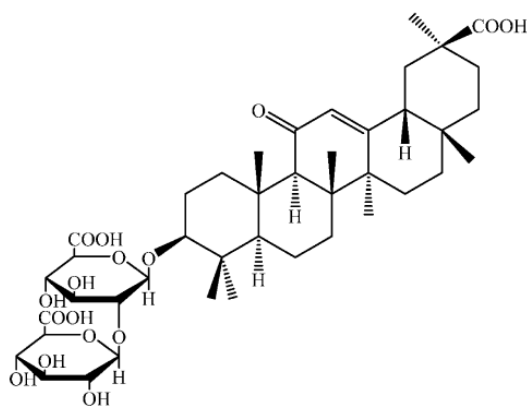


Imagen 10. Estructura química del ácido glicirricínico (GA) (imagen tomada de: Matsuoka *et al.*, 2016).

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, la pandemia generó una carrera creciente en el desarrollo de vacunas, no solo para la salud pública, sino también para la salud animal. Un desafío importante en el desarrollo de vacunas es el diseño y la selección de un vehículo adyuvante para la entrega de moléculas o antígenos, dado que la inmunogenicidad de un antígeno se puede mejorar mediante la adición de un adyuvante. Por lo tanto, el desarrollo de adyuvantes es de gran importancia ya que pueden ser vistos como un modelo de equilibrio que logra el máximo aumento de la respuesta inmune (adyuvanticidad) con efectos secundarios perjudiciales mínimos en el huésped (reactogenicidad). Dentro de sus componentes, las saponinas juegan un rol importante en la respuesta causada por el nanocomplejo. En este sentido, el GA ha adquirido gran interés farmacéutico, principalmente como agente en el desarrollo de sistemas de entrega de fármacos o compuestos inmunoestimulantes (antígenos, por ejemplo). Recientemente, se ha demostrado que las LNPs-GA tienen la capacidad de modular la respuesta inmune, incrementando los efectos de inmunidad humoral y, al mismo tiempo, regular los mediadores de la inflamación, por lo que extiende aún más su uso con fines terapéuticos. Así mismo, las proteínas recombinantes tienen suma importancia debido a su empleo como antígenos en el desarrollo de vacunas (vacunas de subunidades antigénicas). Por ello, el uso de los antígenos recombinantes M del SARS-CoV-2 y NTD-S del VDEP, acoplados con las LNPs, podrían favorecer el desarrollo de estrategias para mitigar los eventos infecciosos por los Coronavirus, ya sea para medicina pública o veterinaria.

4. HIPÓTESIS

El complejo de nanopartículas lipídicas con ácido glicirricínico acoplado a proteínas recombinantes de coronavirus potenciará la respuesta inmunogénica en ratones inoculados, por lo que aumentará la inmunidad humoral (producción de anticuerpos) y la respuesta celular (producción de citocinas) contra las proteínas recombinantes virales.

5. OBJETIVO

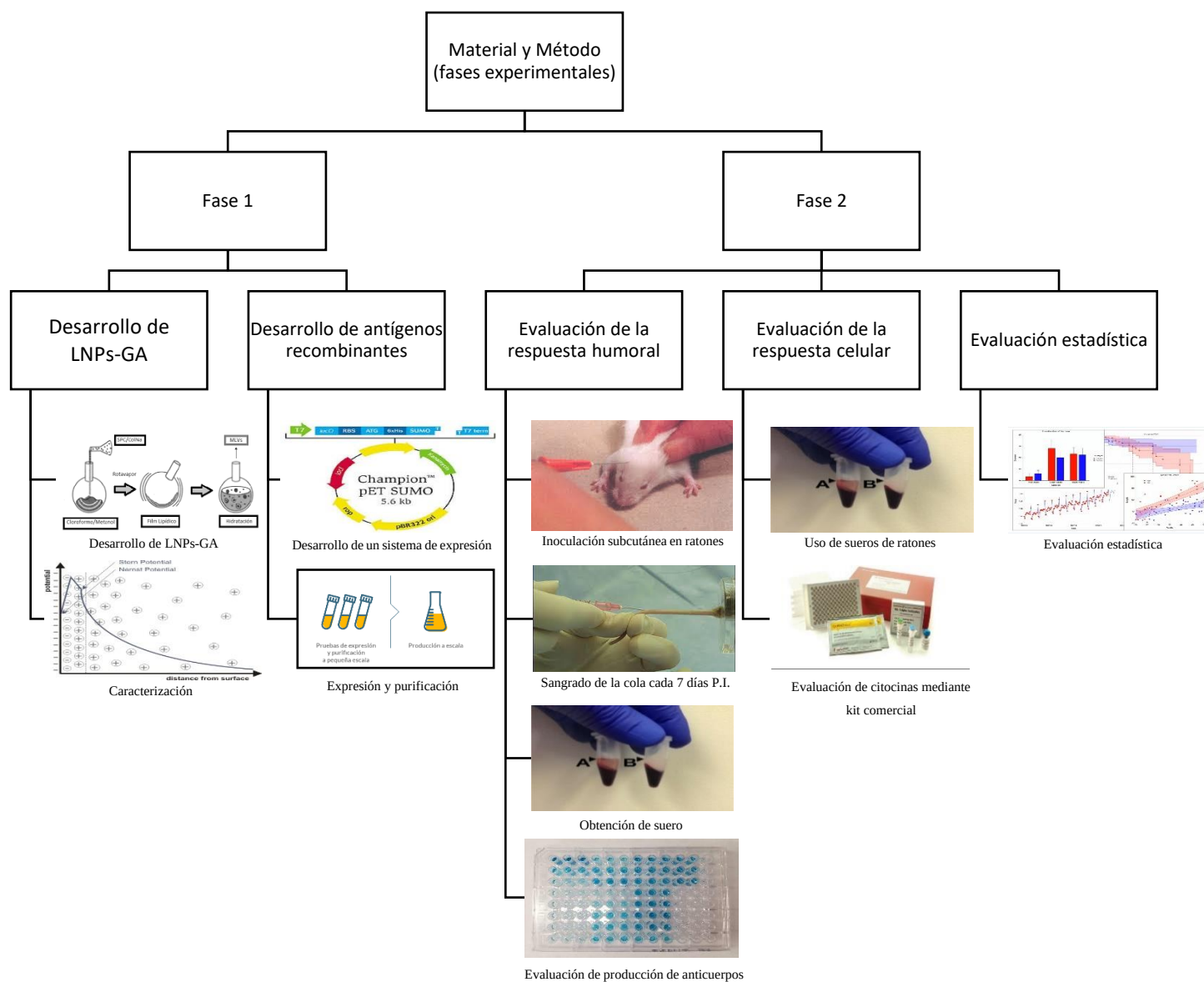
Evaluar los efectos inmunogénicos de una formulación a base de nanopartículas lipídicas con ácido glicirricínico acopladas a proteínas estructurales recombinantes de Coronavirus.

5.1. Objetivos específicos

- Desarrollar y obtener un complejo de nanopartículas con GA acoplado con proteínas recombinantes de Coronavirus.
- Caracterizar la formulación del complejo de nanopartículas de GA acoplado con proteínas recombinantes.
- Evaluar el efecto del complejo inmunoestimulante con GA acopladas a proteínas recombinantes de coronavirus sobre la producción de anticuerpos circulantes.
- Evaluar el efecto del complejo inmunoestimulante con GA acopladas a proteínas recombinantes de coronavirus sobre la producción de citocinas.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Modelo del desarrollo experimental



6.2. Desarrollo de nanopartículas lipídicas con ácido glicirricínico (LNPs-GA)

Para la obtención de las LNPs-GA se empleó el método de filme lipídico (o método de hidratación de filme) descrito por Copland *et al.*, (2000) y Demana *et al.*, (2005), a los cuales se le hicieron modificaciones con respecto a la incorporación de la saponina.

En un matraz de 50 mL se colocó una mezcla de fosfolípidos (L- α -Phosphatidylcholine Sigma® cat P35556) y colesterol (Sigma® cat C8686) en una relación 2:1 (6 mL/3 mL), respectivamente, a una concentración de 10 mg/mL para ambos componentes, disueltos en cloroformo. La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 24-36 h hasta que se evaporó el cloroformo, así formando el filme lipídico. El filme fue rehidratado con 6 ml de saponina (GA) a una concentración de 10 mg/mL (20 μ M) y con 24 mL de Tris-HCl 140 mM pH 7.4 filtrado. El filme fue homogenizado mediante agitación magnética (100 rpm) durante 10 min, hasta homogenizar completamente. Una vez pasado este tiempo, la mezcla fue homogenizada a 15 000 rpm durante 10 min en el equipo IKA T18 Digital UltraTurrax®. Posteriormente, la mezcla homogenizada fue pasada en filtros de 0.8, 0.45 y 0.2 μ m. Puesta en un frasco ámbar y conservada a 4 °C hasta su uso.

6.3. Clonación, expresión y purificación de biológicos recombinantes

Para la obtención de los antígenos recombinantes, los procesos de clonación y expresión fueron llevados a cabo acorde con lo descrito por Lara-Romero *et al.*, (2022).

6.3.1. Proteína de membrana recombinante (rM) del virus SARS-CoV-2

6.3.1.1. Amplificación del marco de lectura codificante del gen M

Muestras de cDNA correspondientes al virus SARS-CoV-2 fueron obtenidas de muestras pacientes con Covid-19, proporcionadas por la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch, de la facultad de química, UNAM. Oligonucleótidos correspondientes al marco de lectura del gen M (Fw 5'- GCA GAT TCC AAC GGT ACT ATT ACC-3'; Rv 5'- GCG CTA CTA CTG TAC AAG CAA AGC-3') fueron diseñados a partir de la secuencia de referencia del primer aislamiento de SARS-CoV-2 (número de acceso: MN908947) y fueron empleados para la reamplificación del gen M.

6.3.1.2. Clonación del gen M en el vector pJET1.2/blunt

Los fragmentos amplificados del gen M (672 pb), 5640 y 5592, se purificaron directo de reacción mediante el kit comercial FAVORGEN® Gel/PCR Purification Mini Kit. Las muestras purificadas fueron empleadas para la inserción en el vector de resguardo pJET1.2/blunt. Las muestras obtenidas de PCR se cuantificaron en el gel de electroforesis con respecto al marcador de masa molecular de concentraciones conocidas. Los insertos fueron usados en una reacción molar 1:3 (vector/inserto) en búfer 2X (10 µL), enzima blunting DNA (1 µL) y agua grado biología molecular (4 µL) para completar el volumen hasta 18 µL. Se incubó a 70 °C durante 5 min. Inmediatamente la mezcla se colocó en hielo y se agregó el vector Invitrogen™ pJET1.2/blunt 50 ng/µL (1 µL) y la enzima ligasa (1 µL) para así completar un volumen final de 20 µL. Se incubó a 25 °C durante 24 h. La reacción fue posteriormente usada para transformar células bacterianas competentes.

6.3.1.3. Transformación de células competentes de *Escherichia coli* (*E. coli*)

Los productos de ligación (vector + inserto M) de las muestras 40 y 92 fueron usados para la transformación de células competentes *E. coli* OneShot Top 10 (Invitrogen). Las células fueron preparadas acorde a lo descrito por Cohen *et al.*, (1972). Para comenzar, un precultivo de 5 ml de medio Luria-Bertani (LB), crecido a 37 °C por 18 h, se empleó para inocular 50 mL de medio LB que posteriormente se incubaría para alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.35 unidades de absorbancia (UA) a 600 nm.

Una vez alcanzada la DO, el cultivo se colocó en un tubo de 50 mL y se incubó en hielo durante 10 min. Se obtuvieron las células del cultivo mediante centrifugación a 8000 rpm durante 25 min, donde posteriormente se desechó el sobrenadante. El paquete celular se resuspendió en 15 mL de búfer frío $\text{MgCl}_2\text{-CaCl}_2$ (80-20 mM, respectivamente). Se obtuvieron las células por centrifugación y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió con 1 mL de búfer CaCl_2 0.1 mM frío. En este punto las células son competentes.

200 μL de células competentes se usaron para la transformación. El vector se empleó en un volumen menor a 10 μL e inferior a 50 ng de ADN para la transformación. La mezcla fue colocada en hielo durante 30 min y se llevó a choque térmico a 42 °C por 90 seg. La muestra se colocó en hielo de 1 a 2 min. Se adicionó 800 μL de LB en el tubo y las células se incubaron a 37 °C durante 45 min. Finalmente, se colocaron 200 μL del cultivo de células procesadas en placas de agar LB más antibiótico (Ampicilina) y se dejaron crecer a 37 °C por 24 h.

Las células positivas a la transformación (colonias crecidas en la placa con antibiótico) fueron seleccionadas (selección por colonia) y colocadas en 5 mL de medio LB con antibiótico (Ampicilina 100 $\mu\text{g/mL}$). Las colonias fueron incubadas a 37 °C durante 24 h.

6.3.1.4. Extracción y análisis del DNA plasmídico

Se procedió a extraer los plásmidos de las células transformadas con el ADN del inserto (gen M) de las muestras 40 y 92 mediante el kit comercial FAVORGEN® Plasmid Extraction Mini Kit. Para determinar la integridad del plásmido y el inserto correspondiente al gen M de cada transformación, se realizó una PCR de los plásmidos obtenidos y, posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (1%) para determinar la presencia de dicho inserto. Con la información del gel se pudo realizar la clonación en el vector de expresión.

6.3.1.5. Clonación del gen M en el vector de expresión pET-SUMO

Debido a que la muestra 92 presentaba bandas de amplicón del gen M más intensas con respecto a la muestra 40, se decidió continuar a la siguiente fase con la muestra 92. Los fragmentos amplificados por PCR del inserto/gen M (672 pb) de la muestra 92, que se encontraban en los plásmidos de resguardo (pJET-M) se purificaron directo de reacción mediante el kit comercial FAVORGEN® Gel/PCR Purification Mini Kit. Las muestras purificadas fueron empleadas para la inserción en el vector de expresión Invitrogen™ Champion™ pET-SUMO. Las muestras obtenidas de PCR fueron cuantificadas en el gel de electroforesis con respecto al marcador de peso molecular de concentraciones conocidas. Los insertos fueron usados en una reacción molar 1:3 (vector/inserto) en búfer 10X (1 µL), vector de expresión (2 µL), inserto (4 µL), ligasa (1 µL) y agua grado biología molecular (2 µL) para completar el volumen hasta 10µL. Se incubó a 25 °C durante 24 h. La reacción fue posteriormente usada para transformar células competentes de *E. coli*.

Posterior a la clonación, se prepararon, empleando el mismo proceso anteriormente descrito, células competentes de *E. coli* OneShot Top 10 (Invitrogen) para llevar a cabo su transformación. Las células positivas a la transformación (colonias crecidas en la placa con antibiótico) fueron seleccionadas (selección por colonia) y colocadas en 5 mL de medio LB con antibiótico (Kanamicina 50 µg/mL). Las colonias fueron incubadas a 37 °C durante 24 h.

6.3.1.6. Evaluación del inserto en el vector

Se procedió a extraer los plásmidos de las células transformadas con el ADN del inserto (gen M) mediante el kit comercial FAVORGEN® Plasmid Extraction Mini Kit. Para determinar la integridad del plásmido de expresión y el inserto correspondiente al gen M de cada transformación, se realizó una PCR de los plásmidos obtenidos y una electroforesis en gel de agarosa (1%) para determinar la presencia de dicho inserto.

De manera consecutiva, se realizó una 2^{da} PCR para determinar la orientación del inserto con respecto al origen de replicación. Para esto, se realizó una mezcla de reacción con búfer 10X (2.5 µL), dNTPs 10X (0.5 µL), primer T7-Rev correspondiente a la región terminadora del vector de expresión (0.5 µL), primer Fw gen M (0.5 µL), MgCL 25 mM (2.5 µL), Taq polimerasa (0.5 µL) y agua grado biología molecular (13 µL) para alcanzar un volumen de 20 µL.

A esta mezcla se incorporó 5 µL de una dilución 1:10 de plásmidos de las células transformadas y se procedió a realizar la PCR (TM= 67 °C). Los análisis fueron observados en electroforesis de gel de agarosa (1%). A un lado a esto, las muestras que mostraron orientación fueron evaluadas para determinar la integridad del inserto en el vector de expresión mediante secuenciación. El inserto en el vector fue secuenciado usando los iniciadores del vector pET-SUMO (Fw-SUMO y T7-Rev) y los iniciadores correspondientes al gen M (RvMCOV y FwMCOV), en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología (IBT, UNAM), mediante secuenciación automatizada en un equipo Applied Biosystems.

6.3.1.7. Obtención de cepas sobreproductoras de la proteína recombinante

Un producto de la muestra 92 (vector de expresión pET-SUMO-M) fue usado para transformar células de expresión competentes BL21/DE3 (INVITROGEN) mediante el procedimiento mencionado (ver apartado “Preparación de células competentes de *E. coli* y transformación”).

Las células positivas a la transformación (colonias crecidas en la placa con antibiótico) fueron seleccionadas (selección por colonia) y colocadas en 5 ml de medio LB con antibiótico (Kanamicina 50 µg/ml). Las colonias fueron incubadas a 37 °C durante 24 h.

6.3.1.8. Expresión de la rM en la cepa BL21/DE3

Las células se cultivaron en medio líquido (10 mL de medio LB más 50 μ L de Kanamicina), y se cultivaron durante 24 h a 37 °C, 250 rpm. Las células se recultivaron en medio líquido (10 mL de medio LB sin antibiótico) a una absorbancia de 0.1 (OD_{600nm}), y se dejaron en crecimiento a 37 °C, 250 rpm, durante 1 h y 30 min, hasta alcanzar una absorbancia (OD_{600nm}) de 0.5. Una vez alcanzada esta absorbancia, se añadieron 30 μ L de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), a una concentración final de 1.5 mM, para inducir el promotor que expresará a la proteína M, y se dejó en crecimiento el medio durante 24 h, 37 °C, 250 rpm.

Pasado este tiempo, el cultivo fue alicuotado en tubos de 1 mL (volúmenes de cultivo de 150-200 μ L), y fueron centrifugados a 10 000 rpm por 3 min. Los tubos fueron decantados y se conservó el pellet celular. Para el análisis de expresión se utilizaron dos tubos, el resto fue almacenado a -20 °C. Un tubo fue tratado con 60 μ L de búfer reductor 1X (Tris base, SDS, β -mercaptoetanol, glicerol y azul de bromofenol), se homogenizó el pellet y se incubó a baño maría durante 10 min. El segundo tubo con células fue tratado adicionalmente con Sarcosyl al 10% y también se le agregó búfer reductor.

Se prepararon 2 geles de poliacrilamida (12% de acrilamida más SDS al 10%), los cuales se colocaron en cámara de corrida para SDS-PAGE con su respectivo búfer (Tris base, glicina y SDS). Las muestras reducidas fueron cargadas (15 y 20 μ L) a los geles y se corrieron a 75 V (15 min) y 100 V (2 h). Finalizado el proceso, uno de los geles fue puesto en solución de Coomassie (metanol, ácido acético glacial y azul

brillante de Coomassie), durante 45 min de teñido y 15 min de desteñido (solución metanol y ácido acético glacial).

El otro gel fue empleado para realizar la transferencia (método semi-seco) de las muestras en membrana de nitrocelulosa. La membrana y el gel fueron puestos en búfer de transferencia (Tris base, glicina, SDS, metanol) durante 15 min. Papel filtro fue humedecido con búfer de transferencia y se colocó en el equipo Bio-Rad® Trans-Blot SD Semi Dry Transfer cell (2 capas). Posteriormente, se colocó la membrana de nitrocelulosa encima del papel filtro y después el gel de poliacrilamida que contiene las muestras de interés. Finalmente se colocó 2 capas de papel filtro y se puso la cubierta del equipó. La transferencia se realizó durante 50 min a 24 V.

6.3.1.9. Expresión de proteína rM mediante Inmunodetección

Se realizó el análisis de la proteína rM mediante western blot. Posterior a la transferencia, la membrana se colocó en búfer de lavado (PBS-Tween 20 al 1%) durante 5 min. Fue bloqueada con leche descremada light al 5% durante 2 h a temperatura ambiente, 70 rpm.

Se retiró la leche e inmediatamente se colocó el anticuerpo primario anti-histidina (anticuerpo monoclonal que detectará la cola de polihistidina que está en el dominio N-terminal de la proteína rM), durante 2 h a temperatura ambiente, 70 rpm. La membrana fue lavada con búfer de lavado 3 veces (cada lavado consta de 10 min) y se cambió de recipiente, en donde se incorporó el anticuerpo secundario anti-ratón (anticuerpo monoclonal que detectará al anticuerpo primario) y se dejó en incubación

durante 2 h a temperatura ambiente, 70 rpm. Finalizado el tiempo, la membrana fue lavada 3 veces (10 min en cada lavado) y dispuesta para el revelado. Al mismo tiempo, se prepararon 20 mL de la solución de revelado (PBS pH 7.4 filtrado, 0.0125 g de DAB y 25 μ L de H₂O₂). En un recipiente se colocó la solución de revelado y se colocó la membrana hasta esperar la reacción de expresión (bandas de revelado en la masa molecular de la proteína rM, mediante reacción por oxidación), la cual se paró colocando la membrana en agua destilada.

6.3.2. Dominio N-terminal de la proteína S recombinante (rNTD-S) del virus VDEP

La secuencia codificante del fragmento NTD de la proteína S (NTD-S) del VDEP (909 pb), obtenido de la secuencia de referencia PEDV/MEX/MICH/01/2013 (número de acceso: KY828999) (Lara-Romero *et al.*, 2018), fue previamente clonado en el vector y sistema de expresión pET-SUMO y BL21/DE3, respectivamente, por el grupo de trabajo del laboratorio de virología II en el CENID-SAI. Para su análisis y obtención, se siguió el protocolo de expresión y evaluación de la proteína rM de SARS-CoV-2, previamente descrito.

6.3.2.1. Obtención y solubilización de la proteína rNTD-S

Las células se cultivaron en medio líquido (200 mL de medio LB sin antibiótico) a una absorbancia de 0.1 (OD_{600nm}), y se dejaron en crecimiento a 37 °C, 250 rpm, durante 1 h y 30 min, hasta alcanzar una absorbancia (OD_{600nm}) de 0.5. Una vez alcanzada esta absorbancia, se añadió 600 μ L de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), a

una concentración final de 1.5 mM, para la inducción del gen que expresará a la proteína rNTD-S, y se dejó en crecimiento el medio durante 24 h, 37 °C, 250 rpm. Las células fueron lisadas mediante el método físico de homogenización a alta presión usando el equipo APV Gauling 15MR-8TA (550 kg/cm² durante 15 min). Posteriormente, el lisado fue colectado y centrifugado a 10 000 rpm en tubos de 15 mL, esto con el fin de obtener la fase soluble (sobrenadante) e insoluble (cuerpos de inclusión). Debido a que la proteína recombinante se forma en cuerpos de inclusión, se descartó el sobrenadante.

Para la solubilización de los cuerpos de inclusión, se dispusieron en una mezcla de 250 µL de Tris-HCL 1 M, 1 g de SDS, 2.5 mL de β-mercaptoetanol y agua destilada, en un volumen total de 50 mL. La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 24 h, 250 rpm. La mezcla fue colocada en membrana de celulosa y dializada en búfer Tris-HCL 5 mM durante 24 h en agitación magnética baja (80 rpm). Durante este tiempo se realizaron 3 cambios de búfer, 2 en intervalos de 3 h y uno en un tiempo de 24 h.

Después de la diálisis, la muestra fue colocada en un matraz de 250 mL y se colocó 9% de Sarcosyl más Tris-HCL pH 7.4 (hasta completar 50 mM), y se dejó en reposo durante 24 h, 250 rpm a temperatura ambiente.

6.3.2.2. Purificación de la proteína rNTD-S

La muestra fue purificada en un solo paso mediante cromatografía de afinidad por iones inmovilizados (IMAC), por método manual en columna fija, acorde lo descrito por Lara-Romero *et al.*, (2022). Una columna Cytiva HisTrap™ con 6% de agarosa (5 mL) fue activada mediante el paso de soluciones en el siguiente orden: Agua destilada filtrada (30 mL), EDTA 0.2 M (10 mL), NaCl 0.5 M (10 mL), NaOH 0.5 M (10 mL), Agua destilada filtrada (20 mL), Cloruro de Níquel 0.2 M (5 mL), Agua destilada filtrada (30 mL) y Solución de equilibrio (Tris-HCl 50 mM pH 8) (30 mL). Previamente la muestra de proteína solubilizada fue ajustada a pH 8 y filtrada por 0.45 µm. La muestra fue pasada por columna en un flujo controlado de 3 mL/minuto, con un reposo de 5 min cada 5 mL. Posteriormente, se pasaron por columna 20 mL de solución de lavado (Tris-HCl 50 mM pH 8, Imidazol 30 mM). Finalmente, se pasaron 15 mL de solución de elusión (Tris-HCl 50 mM pH 8, 250 mM Imidazol). Para corroborar la presencia de la muestra de proteína se colectó 1 mL de muestra de “no pegado”, 1 mL de “lavado” y se colectaron los 15 mL de la elusión (por mililitro). La columna fue limpiada con agua destilada filtrada (30 mL) y conservada en forma vertical y en refrigeración.

Las muestras de elusión (que contienen la proteína rNTD-S purificada) fueron dializadas. Se colocaron en membrana de celulosa y se dispusieron en búfer Tris-HCl 5 mM durante 24 h, con 3 cambios en intervalos de 2 h cada uno. Con esto, la proteína fue limpiada del Imidazol y estuvo en condiciones para ser usada en un modelo biológico. Al concluir, las muestras fueron analizadas en SDS-PAGE y western blot, y finalmente fueron cuantificadas mediante el método de Bradford.

6.4. Caracterización del complejo de LNPs-GA acopladas con la proteína recombinante

Para evaluar la formación de LNPs-GA se analizaron 3 parámetros: tamaño de la nanopartícula, forma y estabilidad (potencial Z).

6.4.1. Evaluación del tamaño del complejo

Las mediciones del tamaño de las nanopartículas se realizaron por triplicado usando la técnica de dispersión de luz en un ángulo de 90° por 180 s, a 25 °C, en el equipo Coulter N4 plus NANOSIZER® (CA, USA) en el laboratorio de tecnología farmacéutica de la Facultad de Estudios Superiores campus Cautitlán, Izcalli, UNAM, acorde con lo mencionado por Urbán-Morlán *et al.*, (2010). La longitud de onda de la luz láser (He/Ne, 10 mW) se fijó en 678 nm. Se utilizó un sensor digital para analizar los datos de intensidad de dispersión en un modo de análisis unimodal. Para la comparación entre controles y la muestra de interés, se midieron muestras de proteína rNTD-S, GA, LNPs-GA y LNPs-GA-rNTD-S a una concentración de 5 mg/mL.

6.4.2. Análisis morfológico de las nanopartículas

La evaluación de la forma de los LNPs-GA se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) en el laboratorio de microscopía electrónica de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), unidad Iztapalapa, siguiendo la metodología de Cao *et al.*, (2011). Una gota de la muestra fue colocada en una rejilla de cobre durante 5 min. El exceso de líquido fue removido con papel filtro sin tocar el centro de la rejilla.

Después de que la rejilla se secó parcialmente, se colocó una gota de solución de fijación (ácido fosfotungsténico al 2%) durante 5 min. El exceso de líquido fue removido nuevamente con papel filtro y la rejilla fue dejada en reposo a temperatura ambiente. Los análisis fueron realizados en el microscopio electrónico de transmisión de alta resolución Jeol JSM7600-F. Para la evaluación del tamaño y dimensiones de las LNPs-GA se empleó el programa ImageJ. Se evaluaron 3 muestras: proteína rNTD-S, LNPs-GA y LNPs-GA-rNTD-S.

6.4.3. Análisis de estabilidad y carga de las partículas

La estabilidad y movilidad electroforética de la dispersión de las LNPs-GA fue medido y los datos fueron usados para obtener el potencial Z aplicando la aproximación Smoluchowski, usando el equipo Malvern Instruments NS ZEN 3600 (Worcestershire, UK) a 25 °C en una celdilla especializada, acorde a lo mencionado por Urban-Morlan (Urbán-Morlán *et al.*, 2010). Se evaluaron 4 muestras: proteína rNTD-S, GA, LNPs-GA y LNPs-GA-rNTD-S. Las muestras fueron analizadas por triplicado.

6.5. Selección e inoculación de un modelo murino

Ratones de la cepa CF-1, hembras de 21 días (3 semanas) de edad, fueron seleccionados y obtenidos de la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE) bajo condiciones de salud y bienestar animal adecuados para su uso. Los animales fueron colocados en camas limpias con aserrín, alimentación *ad libitum* y agua disponible, y resguardados en un área destinada para el manejo y uso de animales inoculados con material biológico recombinante dentro de las instalaciones del laboratorio de Virología II (Epizootiología) del CENID-SAI, según lo estipulado en

la Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio en México, protocolo aprobado y aplicado por el Comité Institucional Interno del INIFAP, bajo los lineamientos de la NOM-062-ZOO-1999.

Se prepararon 6 mezclas: LNPs-GA+PBS (Negativo), proteína rNTD-S+PBS (Positivo), proteína rNTD-S+GA, proteína rNTD-S+LNPs-GA, proteína rNTD-S+MATRIX-M™ (Isconova AB, Sweden) y PBS (Blanco). Las mezclas fueron dispuestas para 6 grupos de ratones (cada grupo conformado por 6 ratones) de manera respectiva. La concentración estimada, según previos resultados obtenidos en el laboratorio, fue de 5 µg por ratón (concentración empleada para la proteína rNTD-S, MATRIX-M™, GA, LNPs-GA), en un volumen, por ratón, de 200 µL.

Se inocularon 200 µL a cada ratón según la mezcla y grupo correspondiente mediante una aplicación vía subcutánea en la región inter-escapular del ratón como indica la Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio en México y según lo estipulado en la norma oficial NOM-062-ZOO-1999. Se aplicaron dos dosis: la primera dosis en el día de obtención de los ratones (día 0) y la segunda dosis se aplicó posterior a 14 días (día 14).

6.5.1. Obtención de muestras de los ratones inoculados

Se sangraron los ratones por la cola (corte en la punta de la cola) cada 7 días post-inoculación y se recolectó la sangre obtenida en tubos de 1.5 mL hasta tener un volumen equivalente a 100 µL. Posteriormente, cada muestra fue centrifugada a 12,000 rpm durante 2 min para obtener suero, el cual fue extraído y conservado en un

tubo nuevo a -70 °C hasta su uso. La obtención de muestras mediante esta metodología fue repetida hasta el día 28 post-inoculación. En el día 35 se llevó a cabo la eutanasia de los ratones mediante punción cardíaca, previa anestesia usando una cámara de CO₂. Todo proceso fue basado de la Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio en México y según lo estipulado en la norma oficial NOM-062-ZOO-1999. De la punción cardíaca se obtuvo 1 mL de sangre por ratón, la cual fue centrifugada a 12 000 rpm durante 2 min y se obtuvo el suero correspondiente, el cual fue extraído y conservado a -70 °C, hasta su uso.

6.6. Evaluación de la respuesta humoral mediante inmunoensayo

Para determinar la respuesta humoral (producción de anticuerpos) estimulada por las dosis aplicadas a los ratones se empleó la prueba de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas indirecto (iELISA), siguiendo el protocolo y recomendaciones de Lara-Romero *et al.*, (2022), lo cual permitiría determinar los niveles y la cinética de producción de anticuerpos de cada grupo de ratones inoculados. El antígeno conocido empleado corresponde a la proteína rNTD-S. La prueba iELISA fue realizada tomando como referencia trabajos previos en el laboratorio y se consideraron los siguientes parámetros: concentración del antígeno (100 ng), dilución de las muestras (dilución 1:200), dilución del conjugado/anti-ratón (1:5000) y tiempo de revelado (10 min). Las mediciones se realizaron por triplicado.

Una microplaca Corning® de 96 pozos planos fue antigenada con 100 ng de la proteína rNTD-S (por pozo) en una mezcla con búfer de carbonato-bicarbonato. La placa fue conservada a 4 °C durante 24 h. Posteriormente, se realizaron 3 lavados a la placa

con 200 μ L de búfer de lavado (PBS-Tween 20 al 0.05%). Se realizó un bloqueo de la placa, incorporando por pozo 100 μ L de una mezcla de PBS y leche descremada en polvo al 3%. La placa fue tapada y colocada a 30 °C durante 1 h. Previamente se realizaron diluciones 1:200 de las muestras de los ratones de cada grupo usando como diluyente la mezcla de PBS más leche al 3%. Posterior a ese tiempo, se realizaron 3 lavados con búfer de lavado. Se agregaron 100 μ L por pozo de las diluciones de cada muestra a evaluar. La placa fue tapada y se dejó en incubación a 30 °C durante 1 h. Posterior a ese tiempo, la placa fue lavada 3 veces con búfer de lavado.

Se agregaron 100 μ L por pozo de la dilución 1:5000 del conjugado/anti-ratón. La placa se tapó e incubó bajo las mismas condiciones de incubación anteriores, durante una 1 h. Finalmente, se lavó la placa 3 veces con búfer de lavado y se agregaron 100 μ L de la solución de sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) Thermo Scientific™, y se dejaron transcurrir 10 min. Para parar la reacción de revelado se agregaron 100 μ L por pozo de ácido sulfhídrico 1 N (2 M). Se realizó lectura de la placa mediante un espectrofotómetro de placas bajo una longitud de onda de 450 nm. Los datos fueron capturados y evaluados estadísticamente para realizar su idónea presentación gráfica.

6.7. Determinación de la concentración de citocinas en suero

Se evaluó la concentración de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-1 β en el suero de los ratones inoculados con las dosis de las diferentes mezclas inmunoestimulantes. La evaluación de la concentración de ambas citocinas en suero se realizó mediante el uso del kit comercial ELISA MAX™ Deluxe Set Mouse TNF- α BioLegend (Cat: 430904) y el kit ELISA MAX™ Deluxe set mouse IL-1 β BioLegend (432604). El desarrollo de la

prueba se realizó basándose en las indicaciones que el propio kit comercial provee. Sin embargo, debido a la cantidad de muestra obtenida de los ratones, se redujo el nivel de suero empleado recomendado para la prueba, siendo de 50 µL por pozo.

7. RESULTADOS

7.1. Desarrollo y obtención de proteínas recombinantes

7.1.1. Desarrollo de un sistema de expresión para la proteína rM del virus SARS-CoV-2

7.1.1.1. Amplificación y primera clonación del gen M

Se obtuvo material genético correspondiente al gen M a partir del cDNA de las muestras 5640 y 5592 de pacientes con COVID-19 (proporcionadas por la Dra. Maricarmen Quirazco, F.Q., UNAM), las cuales fueron obtenidas por RT-PCR usando cebadores que permitieron obtener un amplicón de 672 pb (Figura 1) correspondiente al gen (Fw 5'- GCA GAT TCC AAC GGT ACT ATT ACC-3'; Rv 5'- GCG CTA CTA CTG TAC AAG CAA AGC-3'). Una vez obtenidos los amplicones, se procedió llevar a cabo la clonación en el vector de resguardo (pJET) y de expresión (pET-SUMO) en el sistema procarionte.

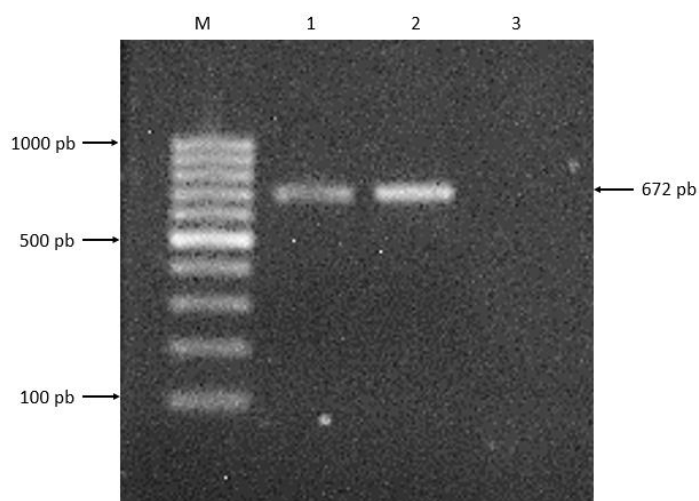


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio de la reamplificación de los cDNAs de las muestras 40 y 92 del gen M. (M) marcador de pares de bases, (1) amplicón de la muestra 40, (2) amplicón de la muestra 92, (3) control negativo.

Los fragmentos amplificados fueron purificados directamente del gel de electroforesis para ser clonados en el vector de resguardo pJET1.2/Blunt (pJET-M) (Figura 2), el cual fue usado para transformar células procariontes *E. coli* Top 10 (Figura 3).

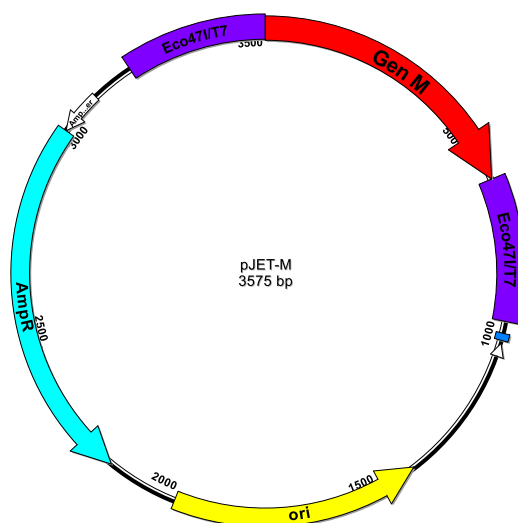


Figura 2. Vector de clonación pJET1.2/blunt con el inserto (gen M/rojo). El vector cuenta con un gen de resistencia a la ampicilina (azul), dos secuencias Eco47I/T7 complementarias que forman una endotoxina (morado), una secuencia ori (amarillo) y un promotor lac UV5 (azul marino).

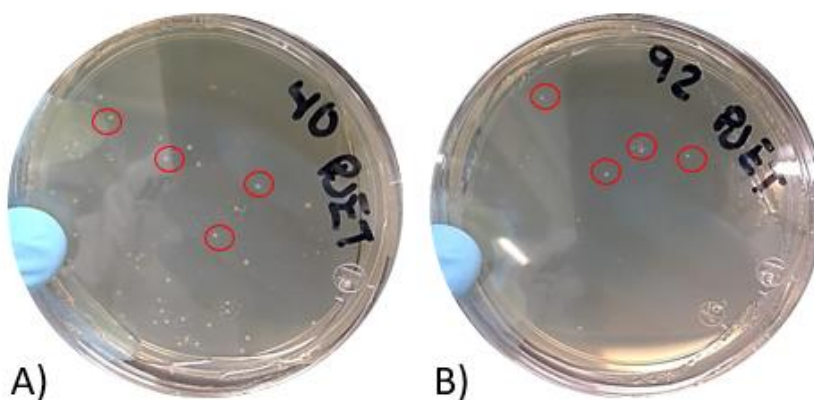


Figura 3. Colonias de células Top10 transformadas con el vector de resguardo pJET-M, crecidas en medio LB con antibiótico (ampicilina). Las colonias marcadas en círculos rojos fueron seleccionadas para su posterior análisis.

Para corroborar el éxito en la transformación de las células y, además, verificar la presencia del inserto (gen M) en el vector, se extrajeron los plásmidos de las células y se evaluó mediante PCR la presencia del gen, usando los cebadores correspondientes al gen M (Figura 4).

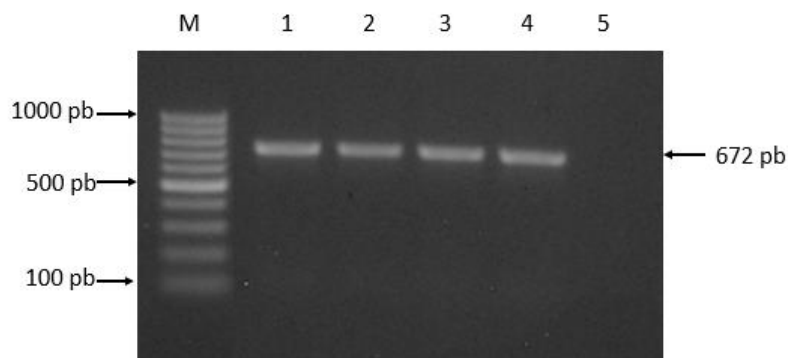


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio de la PCR de los plásmidos pJET-M de las células transformadas (2 de la muestra 40 y 2 de la muestra 92). (M) marcador de pares de bases, (1 y 2) amplicón de la muestra 40, (3 y 4) amplicón de la muestra 92, (5) control negativo.

7.1.1.2. Subclonación del gen M en el vector de expresión

Para llevar a cabo la expresión del gen heterólogo es esencial el uso de un vector con las condiciones necesarias para poder llevar a cabo dicho proceso. El gen M fue insertado en el vector de expresión Invitrogen[™] Champion pET-SUMO (Figura 5) y subclonado en células de *E. coli* Top10, de donde se obtuvieron colonias de células transformadas (Figura 6).

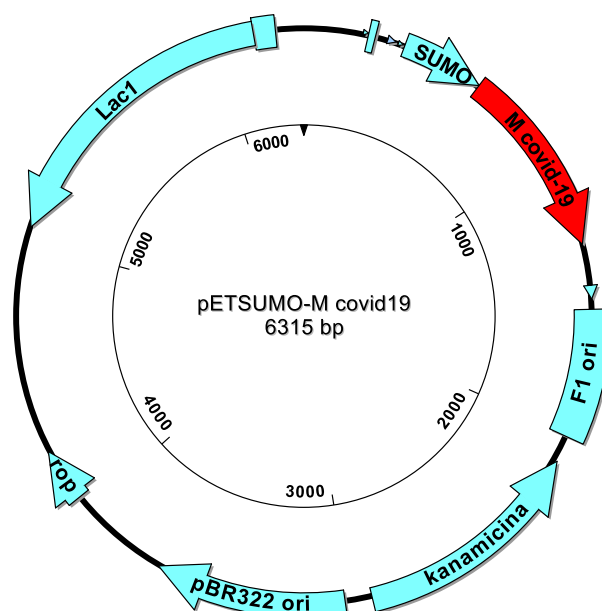


Figura 5. Vector de expresión pET-SUMO con el inserto (gen M/rojo). El vector cuenta con un sitio F1 ori, una región Lac1 para la inducción de la expresión del gen heterólogo, un gen de resistencia a la Kanamicina como marcador de selección, una secuencia pBR322 ori y una región SUMO que favorece el plegamiento de las proteínas sintetizadas, además de contener una secuencia de 6xhys para el reconocimiento y purificación de la recombinante.

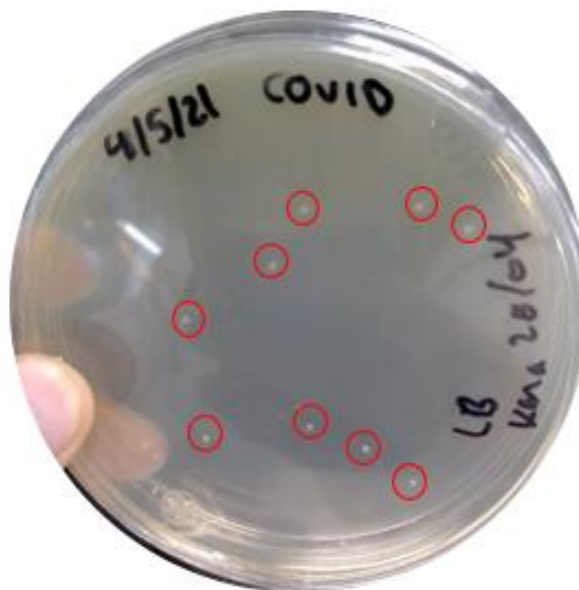


Figura 6. Colonias de células Top10 transformadas con el vector de expresión pET-SUMO-M, crecidas en medio LB con antibiótico (kanamicina). Las colonias marcadas en círculos rojos fueron seleccionadas para su posterior análisis.

Para determinar la existencia del inserto (gen M) en las colonias aisladas, se extrajo plásmidos de las células transformadas y se realizó una PCR para evaluar la presencia del gen (Figura 7). Solo cuatro de nueve colonias evaluadas (plásmidos evaluados) presentaron expresión del gen M (amplicón de 672 pb) en el gel de agarosa.

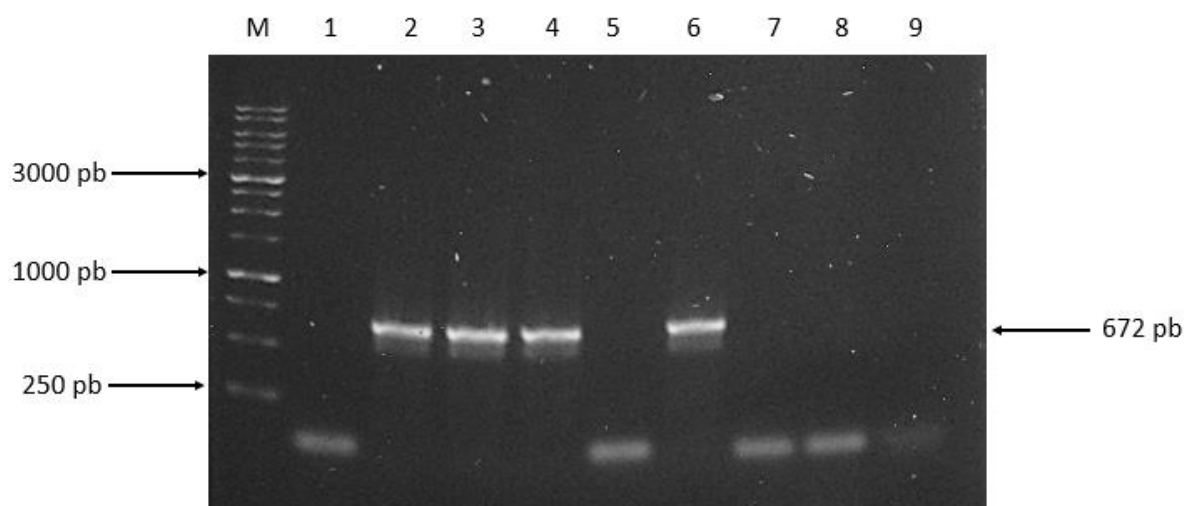


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio de la PCR de los plásmidos pET-SUMO-M de las células Top10 transformadas, donde solo 4 plásmidos presentaron el inserto (2, 3, 4 y 6) (M) marcador de pares de bases, (1-9) muestras de plásmidos evaluados.

Para determinar si la orientación del inserto es correcta (gen M en fase con respecto al origen de replicación del vector), se realizó una 2^{da} PCR usando como oligo Reverse el del vector (incluido en el kit comercial). En la Figura 8 se muestran los amplicones correspondientes a los insertos que se encontraban en correcta orientación en los plásmidos clonados con el gen.

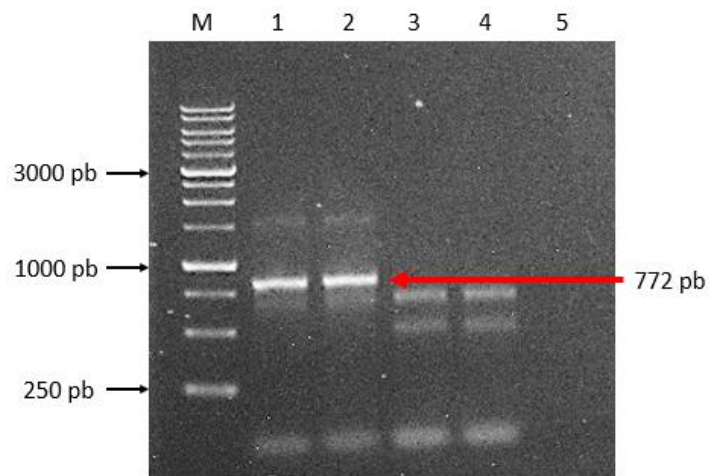


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio de la 2^{da} PCR de los plásmidos pET-SUMO-M de las células Top10 transformadas, donde solo 2 plásmidos presentaron el inserto en orientación (1 y 2). (M) marcador de pares de bases, (1-4) muestras de plásmidos evaluados, (5) control negativo.

Los plásmidos que mostraron una correcta orientación fueron analizados mediante secuenciación en el IBT. La Figura 9 muestra los electroferogramas de las dos muestras, las cuales mostraron bandas confiables y bien definidas, indicando una correcta secuenciación y una buena integridad de los insertos.

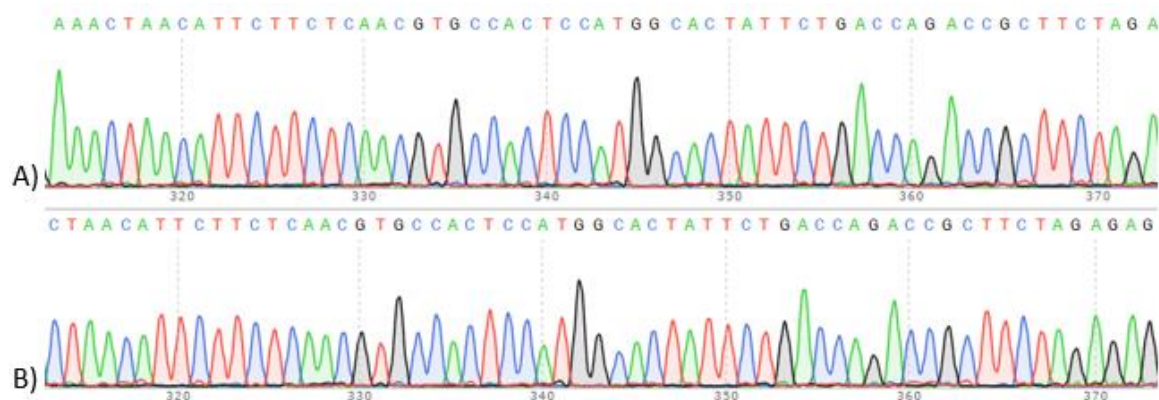


Figura 9. Secuenciación del gen M en el vector pET-SUMO-M de los plásmidos que mostraron que el gen se encontraba en fase.

Así mismo, las secuencias obtenidas fueron evaluadas mediante una comparación de secuencias en BLAST® (NCBI) con respecto a la secuencia de referencia (número de acceso: MN908947), lo que mostró un porcentaje de identidad del 99%.

Considerando estos resultados, se seleccionó uno de los plásmidos que presentaron las características necesarias para ser expresado, el cual se denominó como 9-A. En este sentido, se realizó la transformación en el sistema de expresión procarionte BL21/DE3, de donde se obtuvieron colonias de células transformadas (Figura 10).

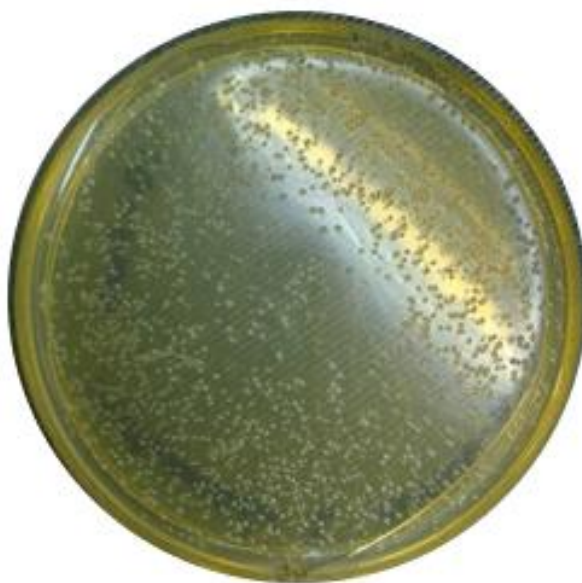


Figura 10. Colonias de células BL21/DE3 transformadas con el vector de expresión pET-SUMO-M (9-A), crecidas en medio LB con antibiótico (kanamicina). Debido a que hubo una sobreproducción de colonias, se trataron de seleccionar las colonias más aisladas en el centro de la placa.

7.1.1.3. Expresión de la proteína rM

Posterior a la transformación de las células de expresión (BL21/DE3) con el vector de expresión (pET-SUMO-M), se procedió a realizar la expresión de la proteína recombinante, la cual presentaría una masa molecular de 35 kDa (25 kDa de la proteína rM y 10 kDa de la etiqueta SUMO), mediante inducción por IPTG. Para evaluar la expresión se realizó una SDS-PAGE (2 geles con el mismo orden de carga). Un gel cargado se empleó para teñirlo con azul Coomassie, sin embargo, no se pudo observar la expresión de la recombinante (análisis no mostrado). El segundo gel, cargado de la misma forma que el gel anterior, se empleó para el análisis de western blot, en donde se pudo identificar la recombinante con la masa molecular esperada (Figura 11).

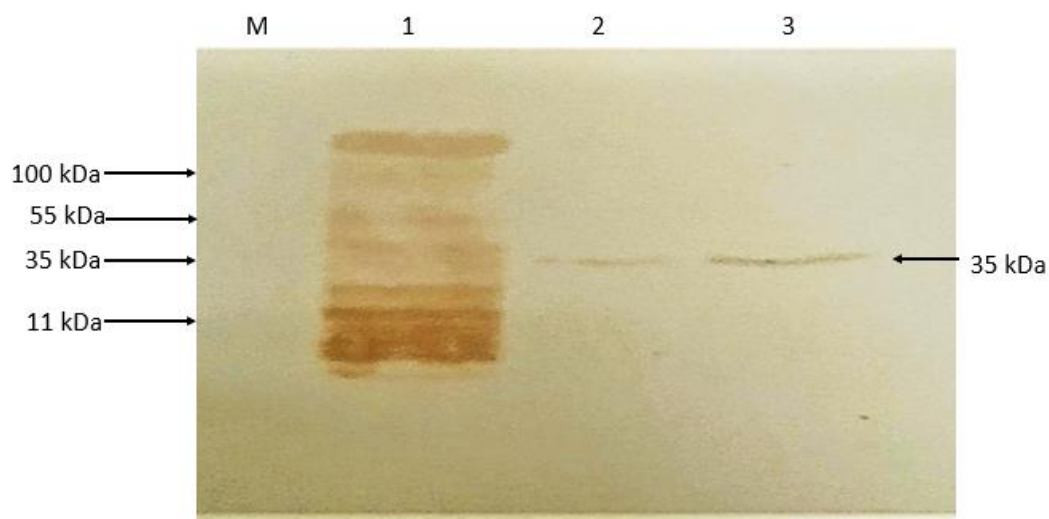


Figura 11. Western blot de las muestras de células que expresan a la proteína rM y de los cuerpos de inclusión solubilizados de la proteína rM. (M) marcador (no visible), (1) Muestra control positivo, (2) Muestra de proteína solubilizada con Sarcosyl 10% (15 μ L de carga), (3) Muestra de proteína solubilizada con Sarcosyl 10% (20 μ L de carga).

7.1.2. Expresión y purificación de la proteína rNTD-S

Como se mencionó anteriormente, el fragmento codificante de la proteína NTD-S se encontraba clonado en el vector y sistema de expresión pET-SUMO y BL21/DE3, respectivamente, por lo que sólo se llevó a cabo la expresión y purificación de esta.

En la Figura 12 se muestran el gel y el western blot en donde se puede observar la banda de expresión de la proteína rNTD-S. Como se puede observar, la banda de expresión es lo suficientemente marcada, lo que demuestra lo anteriormente mencionado, que dicha proteína tiene un buen rendimiento de expresión.

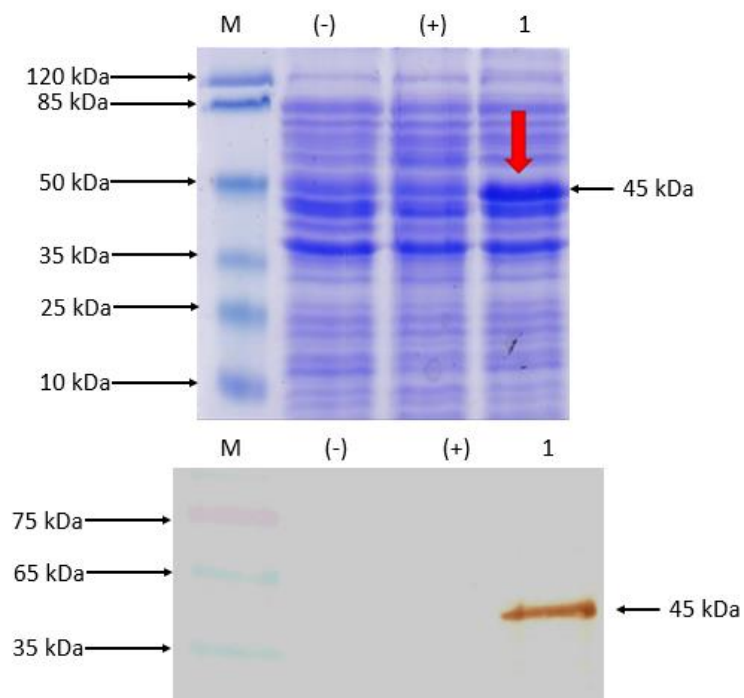


Figura 12. Gel de SDS-PAGE teñido con azul brillante (Coomassie) y western blot de las muestras de colonias transformadas para evaluar la expresión de la proteína rNTD-S de VDEP. (M) marcador, (-) BL21/DE3, (+) BL21-BLV, (1) BL21-NTD-S.

Posterior a los procesos de obtención de cuerpos de inclusión, solubilización y purificación en un solo paso de la proteína mediante IMAC, en la Figura 13 se observa el gel y western blot de la proteína rNTD-S purificada.

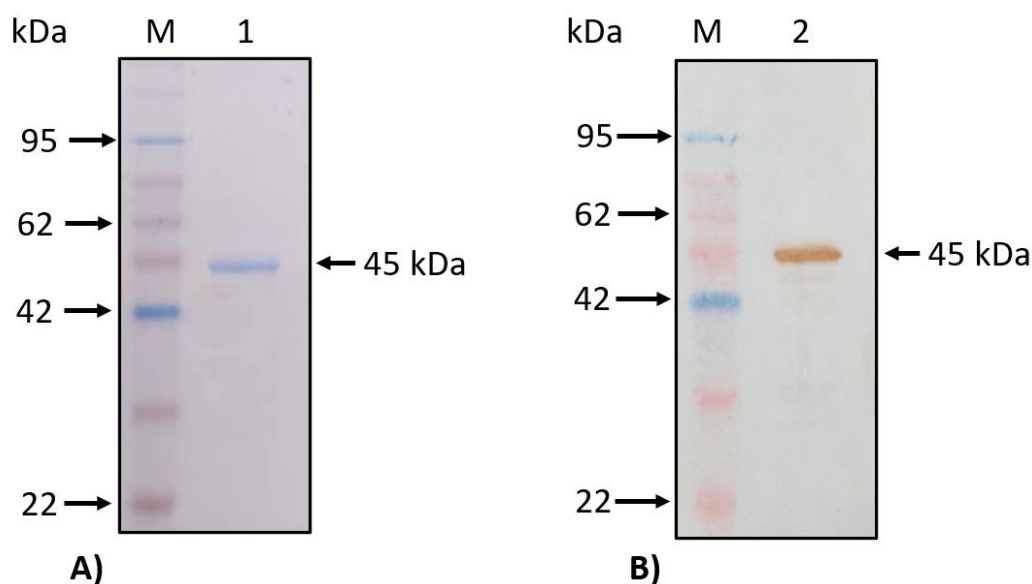


Figura 13. Gel de SDS-PAGE teñido con azul brillante Coomassie (A) y western blot (B) de las muestras de la proteína rNTD-S de VDEP posterior a los procesos de la purificación y diálisis. (M) marcador, (1) rNTD-S.

7.2. Evaluación de nanopartículas lipídicas

7.2.1. Obtención y evaluación del tamaño de las LNPs-GA

Durante el desarrollo de las LNPs-GA mediante el método de filme lipídico (hidratación de film), se sustituyó la saponina de la formulación original (Quillaja) por el GA, el cual fue solubilizado a baño maría (90 °C) en PBS pH 7.4, debido a que a temperatura ambiente el GA se gelifica. La incorporación del GA se realizó inmediatamente y se procedió a la homogenización magnética al mismo tiempo que se agregaba el búfer Tris-HCl 140 mM pH 7.4.

Posterior a la homogenización a 15 000 rpm y al filtrado, se prepararon las mezclas a analizar y se evaluó el tamaño de las partículas en el equipo Coulter N4 plus NANOSIZER®. En la Tabla 1, se muestran los resultados de las mediciones de tamaño de partículas promedio de las muestras (proteína rNTD-S, GA, LNPs-GA y LNPs-GA-rNTD-S), además se muestran los resultados de las mediciones de polidispersión de cada muestra.

Tabla 1. Tamaño de partícula promedio y polidispersión de las muestras de proteína, GA, LNPs-GA y LNPs-GA con proteína. Se muestra el promedio de 3 mediciones por cada muestra.

Muestra	Tamaño* (nm)	Polidispersión*
rNTD-S	2150.3	1.715
GA	205.7	1.8
LNPs-GA	211.5	0.283
LNPs-GA-rNTD-S	347.3	0.648

7.2.2. Análisis microscópico de las LPNs-GA

Mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) se pudo evaluar la morfología y confirmar el tamaño de las partículas formadas. De esta forma, también se evaluó si existía alguna otra estructura formada durante el desarrollo de la formulación.

En la Figura 14 se muestran las micrografías de las muestras de proteína rNTD-S, de los LNPs-GA y LNPs-GA con proteína (LNPs-GA-rNTD-S).

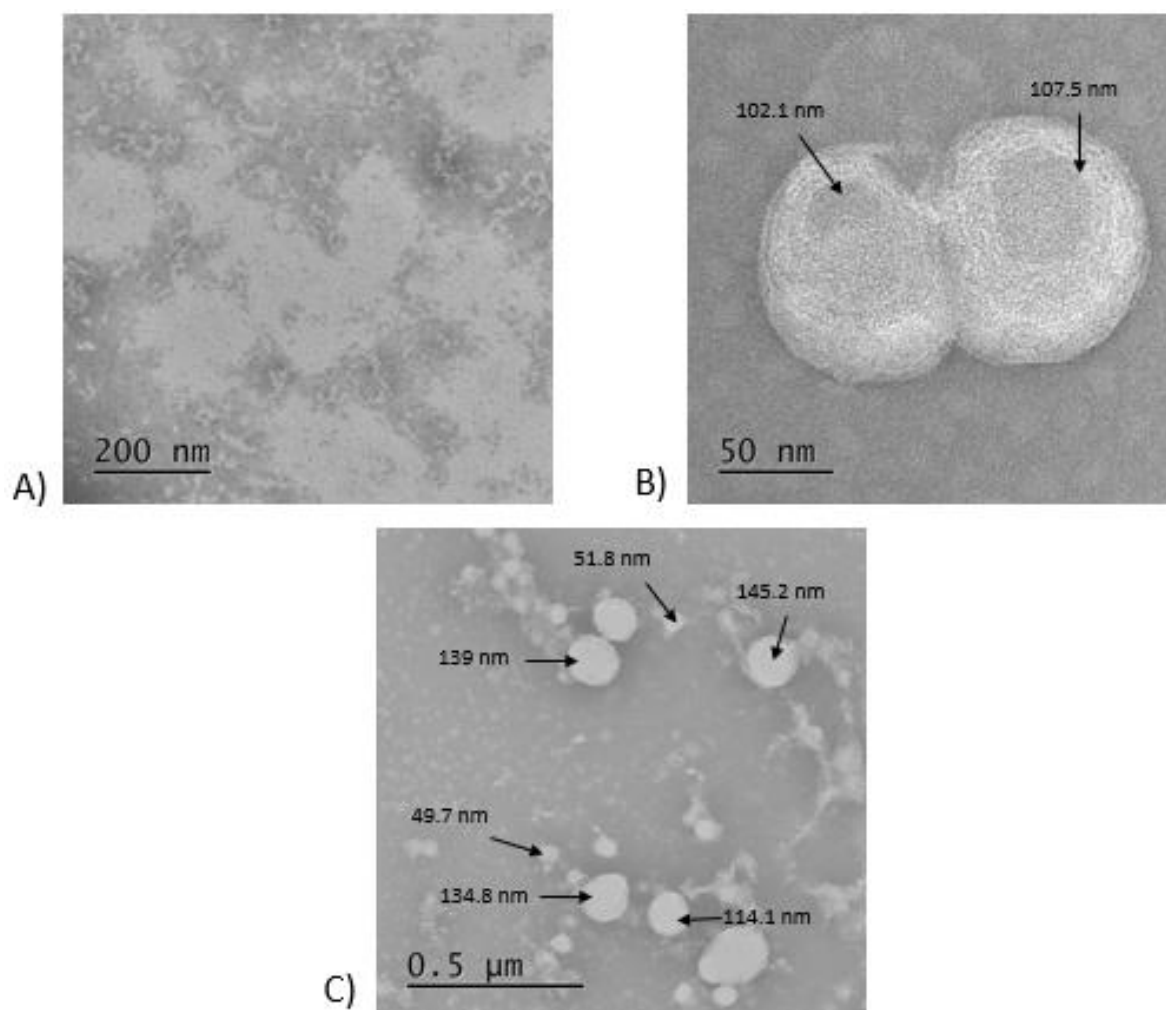


Figura 14. Micrografías en campo claro de la muestra de proteína rNTD-S (A), LNPs-GA (B) y de los LNPs-GA acopladas a la proteína recombinante (C). Las estructuras con mayor electrodensidad corresponden a las LNPs-GA y a la proteína recombinante. Para evaluar el tamaño aproximado de las nanopartículas se utilizó el programa ImageJ.

7.2.3. Evaluación de la estabilidad en dispersión (potencial Z)

Se evaluó la estabilidad (carga) de las partículas en dispersión en el equipo Malvern Instruments NS ZEN 3600. En la Tabla 2 se muestran los valores obtenidos de las mediciones de la muestra de proteína rNTD-S, GA, LNPs-GA y LNPs-GA-rNTD-S.

Tabla 2. Resultados de la evaluación de estabilidad en dispersión (potencial Z) de las muestras de proteína, GA, LNPs-GA y LNPs-GA-rNTD-S. Los datos, así como el valor promedio y desviación estándar de las muestras, fueron proporcionados por el equipo NS ZEN 3600.

Muestra	Potencial Z (mV)*
Proteína rNTD-S	-9.13 ± 4
GA	-16.29 ± 7.32
LNPs-GA	-27.6 ± 9.19
LNPs-GA-rNTD-S	-21.73 ± 8.41

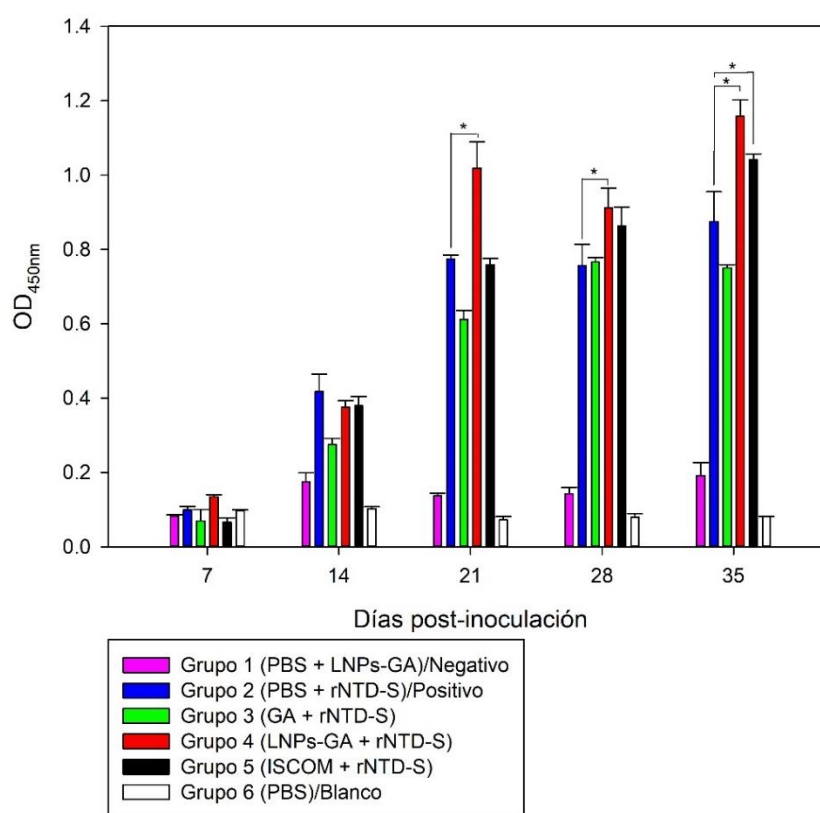
*reportado como promedio ± desviación estándar, n=3.

7.3. Determinación de la respuesta humoral en el modelo murino

La producción de anticuerpos en ratones CF-1, inoculados con las mezclas experimentales, fue evaluada mediante ensayos de iELISA. Los ensayos fueron realizados por triplicado y el número de muestras evaluadas (por grupo) fueron de 6. Es importante resaltar que, durante el tiempo de inmunización de los ratones, aquellos que fueron inoculados con el GA o las LNPs-GA no mostraron efectos adversos en el sitio de inoculación, ni mostraron variaciones en su conducta y alimentación.

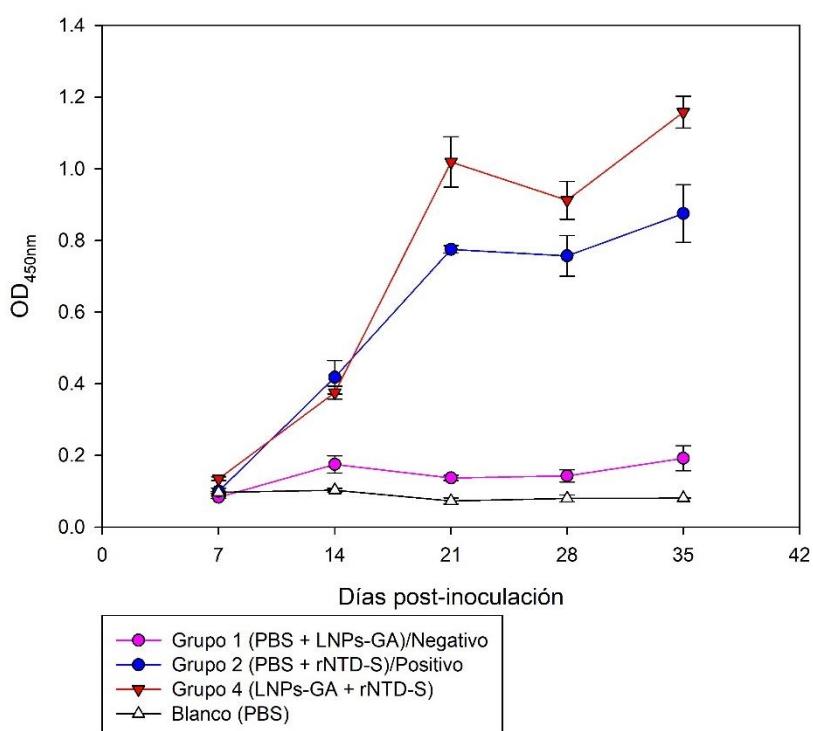
Los resultados y gráfica de la producción de anticuerpos de las muestras evaluadas de los grupos inoculados con las mezclas de la proteína NTD-S recombinante se puede observar en la Gráfica 1. La respuesta de producción de anticuerpos entre los grupos inoculados con las mezclas con la proteína rNTD-S se incrementaron desde la primera inoculación, sin embargo, el grupo inoculado con la mezcla GA+rNTD-S

(Grupo 3) presentó una respuesta menor en la producción de anticuerpos comparado con los otros grupos, inclusive comparado con el grupo positivo. El grupo inoculado con las LNPs-GA y la proteína (Grupo 4) presentó una mayor producción de anticuerpos, siendo superior en contraste con el Grupo 5 (grupo de referencia) y el control positivo (Grupo 2).



Gráfica 1. Evaluación de la respuesta humoral de los grupos inoculados con las mezclas de la proteína rNTD-S. Se puede destacar que el Grupo 4, inoculado con los LNPs-GA, expresó una mayor producción de anticuerpos desde el día 21 post-inoculación comparado con el resto de los grupos. Los análisis estadísticos fueron realizados en los programas estadísticos NCSS y SigmaPlot 12.5 utilizando pruebas de comparación múltiple de Dunnett, considerando diferencias estadísticamente significativas (*) cuando $P < 0.05$.

De manera independiente, se comparó la cinética de producción de anticuerpos (Gráfica 2) de los Grupos 1, 2 y 4 con el fin de visualizar la capacidad inmunoestimulante de las LNPs-GA y la proteína rNTD-S. Evidentemente, el Grupo 4 inoculado con los LNPs-GA y la proteína presentaron una respuesta superior al control positivo (Grupo 2).

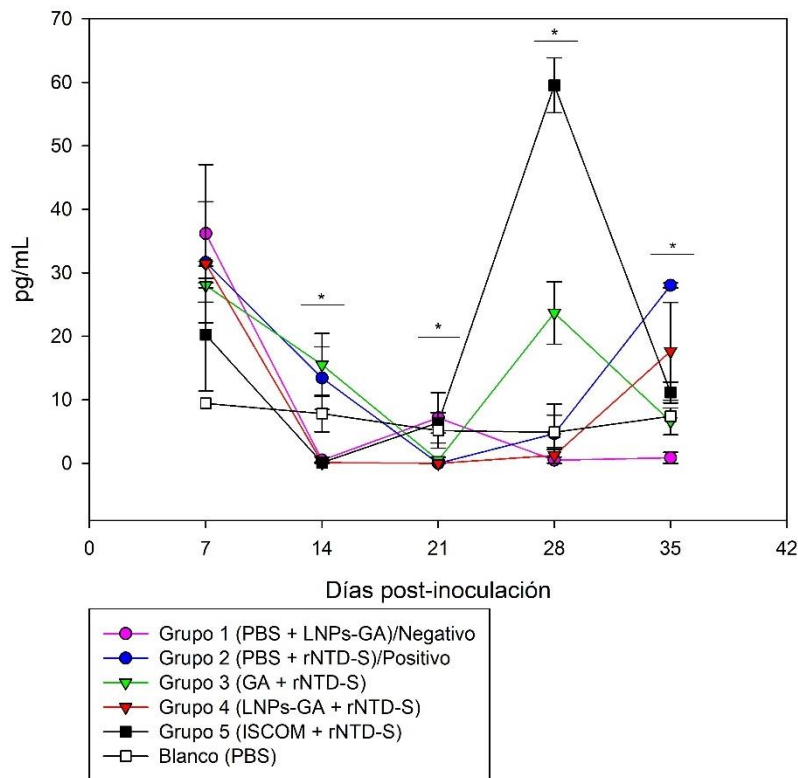


Gráfica 2. Comparación de la cinética de producción de anticuerpos de los grupos inoculados con las mezclas inmunoestimulantes. Se observa que el Grupo 4 fue superior en la producción de anticuerpos a partir del día 21 comparado con el grupo control positivo (Grupo 2), lo que generó diferencias significativas hasta el día 35. Los análisis estadísticos fueron realizados en los programas estadísticos NCSS y SigmaPlot 12.5 utilizando pruebas de comparación múltiple de Dunnett, considerando diferencias estadísticamente significativas (*) cuando $P < 0.05$.

7.4. Evaluación de la concentración de citocinas en suero

Para complementar la información relacionada con la actividad inmunoestimulante del complejo lipídico con o sin antígeno recombinante, se evaluaron los niveles de concentración de las citocinas TNF- α y IL-1 β en sueros de los animales inmunizados.

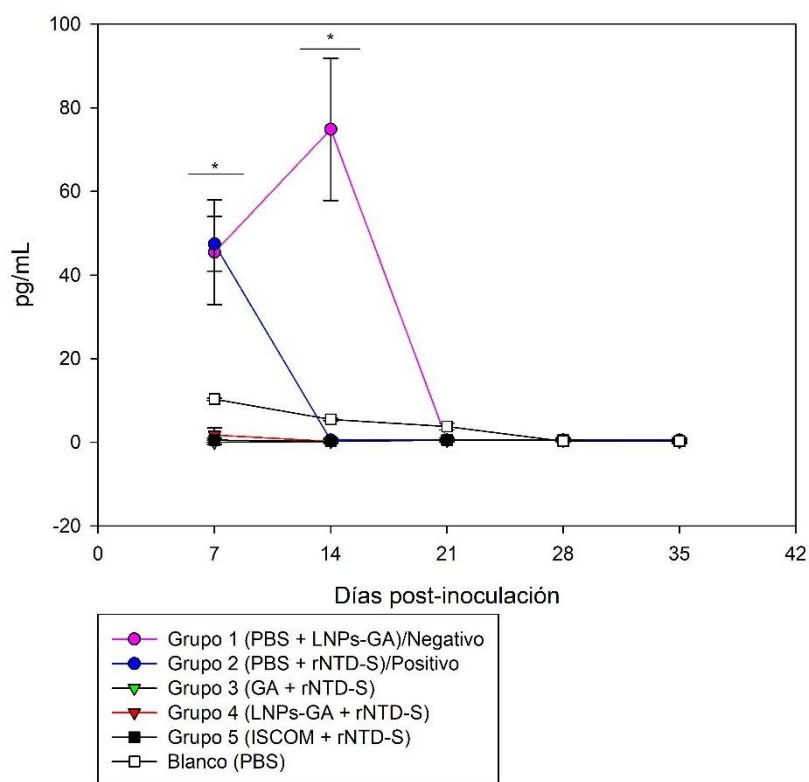
Los análisis de la evaluación de la concentración de la citocina TNF- α en suero se muestran en la Gráfica 3. Inicialmente, se puede observar que la concentración de TNF- α en suero del grupo blanco (PBS) es basal, esto debido a que no fueron inmunoestimulados, por lo que los datos fueron considerados como referencia con respecto a los otros grupos evaluado. Posterior a los 14 días post-inmunización, los niveles de TNF- α disminuyeron para los grupos 1 (negativo) y 4, los cuales contenían las LNPs-GA. Particularmente, el grupo 4 mostró un incremento de esta citocina en el día 35 post-inmunización. El grupo 2 (positivo) mostró una tendencia de decremento-incremento en la concentración de la citocina, siendo en su mayoría superior al grupo 4, y su comportamiento fue similar para el grupo 3 (GA + rNTD-S). El grupo 5, por otro lado, mostró los niveles más elevados de TNF- α en suero durante el experimento. En general, se observa que los grupos que contienen las LNPs-GA (con o sin la proteína recombinante), muestran una menor concentración en los niveles de TNF- α , siendo inferiores comparado con el control positivo (grupo 2). Se mostraron diferencias estadísticas entre grupos en los días 14, 21 y 35 post-inmunización con respecto al control.



Gráfica 3. Evaluación de la concentración de TNF- α en suero de ratones inmunizados. La evaluación se realizó usando sueros obtenidos cada 7 días post-inmunización hasta el día 35, en un kit de ELISA. Los análisis estadísticos fueron realizados en los programas estadísticos NCSS y SigmaPlot 12.5 utilizando pruebas de comparación múltiple de Dunnett, considerando diferencias estadísticamente significativas (*) cuando $P < 0.05$.

Por otro lado, la evaluación de la concentración de la citocina IL-1 β se muestra en la Gráfica 4. Al igual que el análisis anterior, se observa que la concentración de IL-1 β del grupo blanco (PBS) fue basal debido a la ausencia del inmunógeno, por lo que fueron usados como control. A partir del día 14 post-inmunización, los niveles de IL-1 β disminuyeron a niveles indetectables en todos los grupos. Interesantemente, el grupo

1 (negativo) mostró niveles más elevados en los primeros días. A pesar de no contener LNPs-GA, el grupo 2, a partir del día 14 post-inmunización, no mostró niveles detectables de la citocina. El grupo 4 sólo mostró niveles de detección mínima en el día 7.



Gráfica 4. Evaluación de la concentración de IL-1 β en suero de ratones inmunizados. La evaluación se realizó usando sueros obtenidos cada 7 días post-inmunización hasta el día 35, en un kit de ELISA. Los análisis estadísticos fueron realizados en los programas estadísticos NCSS y SigmaPlot 12.5 utilizando pruebas de comparación múltiple de Dunnett, considerando diferencias estadísticamente significativas (*) cuando $P < 0.05$.

8. DISCUSIÓN

El presente trabajo tuvo como interés el desarrollo y la evaluación de un complejo inmunoestimulante formulado con antígenos recombinantes de coronavirus de interés en salud y economía, y de un adyuvante formado por nanopartículas lipídicas con ácido glicirricínico que, en conjunto, generarían una respuesta inmune humoral eficiente a un lado de un efecto inmunomodulador propiciado por el mismo modelo adyuvante.

Se logró la expresión exitosa de la proteína M de SARS-CoV-2 en un sistema procarionte, a pesar de su posterior falta de solubilidad y purificación, es un paso significativo en la producción de antígenos recombinantes. Aunque la obtención de proteínas de membrana en sistemas de expresión procarionte, especialmente en *E. coli*, es conocida por ser un desafío debido a la falta de maquinaria de plegamiento y glicosilación (Kaur *et al.*, 2018), la obtención de las bandas de expresión de la proteína recombinante es un logro en sí mismo. Estos resultados apuntan a la necesidad de investigar aún más estrategias para mejorar la solubilización de esta proteína, posiblemente utilizando sistemas de expresión eucariontes o sistemas de expresión procariontes optimizados para mejorar la producción de proteínas de membrana. Por otro lado, el éxito previo en la expresión y purificación de la proteína rNTD-S respalda su elección como antígeno en este estudio. Este hallazgo sugiere que esta proteína puede ser una opción prometedora para el desarrollo de vacunas y terapias basadas en antígenos recombinantes contra SARS-CoV-2 y otros coronavirus relacionados.

La formulación de LNPs que incorpora el GA como adyuvante es una estrategia innovadora para mejorar la eficacia de las vacunas y terapias basadas en antígenos (Thakur *et al.*, 2020). La elección del GA se basó en su capacidad documentada para estimular la respuesta inmune y su interacción efectiva con antígenos recombinantes (Pashkina *et al.*, 2022; Castañeda-Montes *et al.*, 2022). La obtención de LNPs con tamaños que oscilan entre 50 y 150 nm es particularmente interesante, ya que este rango de tamaño se ha asociado con respuestas inmunes más efectivas, incluida la producción de anticuerpos y la activación de células T (Shah *et al.*, 2014). Estos resultados sugieren que las LNPs-GA pueden ser una plataforma prometedora para la entrega de antígenos y podrían tener un papel relevante en futuros desarrollos de vacunas y terapias.

El valor del potencial Z de -27.6 mV sugiere que las LNPs-GA son muy estables en dispersión, lo que es esencial para su uso como vehículos de entrega. La carga negativa y el tamaño relativamente pequeño de las partículas son propiedades que favorecen su distribución en sistema linfático (Nakamura *et al.*, 2020), lo que mejora la interacción con las células del sistema inmunológico. Estos hallazgos respaldan la idoneidad de las LNPs-GA como vehículos de entrega de antígenos. La interacción entre la proteína recombinante y las LNPs-GA, que resulta en un aumento del tamaño y una disminución del potencial Z, indica que estos componentes interactúan de manera efectiva (Mayoral *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2021). Esta interacción puede ser ventajosa para la presentación del antígeno a las células del sistema inmunológico y puede tener un impacto positivo en la respuesta inmune inducida.

La eficacia de las LNPs-GA y la proteína rNTD-S en la promoción de una respuesta inmune humoral robusta es un resultado alentador. La producción elevada de anticuerpos que se mantiene a lo largo del experimento es particularmente importante, ya que sugiere una inmunidad duradera (Payne, 2017), lo que es crucial para la protección a largo plazo contra infecciones virales como el SARS-CoV-2.

La modulación de citocinas inflamatorias como el TNF- α e IL-1 β por el GA es un hallazgo interesante. La disminución en los niveles de TNF- α podría indicar un efecto antiinflamatorio del GA (Richard, 2021), lo que es relevante para el control de respuestas inflamatorias excesivas que a menudo se asocian con efectos adversos en las vacunas. La prolongada presencia de IL-1 β en el grupo tratado con LNPs-GA sugiere un posible efecto inhibitorio del GA en esta citocina lo que es consistente con otros trabajos publicados (Liu et al., 2014), lo que merece una investigación adicional.

En resumen, este estudio ha demostrado avances significativos en la producción de antígenos recombinantes, la formulación de LNPs-GA como vehículos de entrega de antígenos y la inducción de respuestas inmunes robustas. Estos resultados respaldan la continuación de la investigación en esta dirección y plantean nuevas preguntas sobre el papel del GA en la modulación de la respuesta inmune. Estos hallazgos tienen el potencial de contribuir al desarrollo de vacunas y terapias más efectivas contra enfermedades virales, como la COVID-19. Sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales para comprender completamente los mecanismos subyacentes y optimizar aún más estas estrategias.

9. CONCLUSIONES

- El complejo de LNPs-GA y la proteína rNTD-S demostraron una capacidad de inducción de la respuesta humoral óptima, lo que representa un modelo prometedor en el desarrollo de vacunas e inmunoterapias.
- La prolongada producción de anticuerpos es un resultado prometedor, debido a que el uso de las LNPs-GA podría permitir una inmunidad duradera, lo que disminuiría el número de dosis y evitaría infecciones virales a largo plazo.
- Las LPNs-GA mostraron capacidad de disminuir la concentración de dos citocinas de respuesta inflamatoria, lo que indica que tienen el potencial para modular la respuesta de inflamatoria propiciada por las citocinas evaluadas. En este sentido, el proyecto abre la posibilidad de continuar con la evaluación de estos adyuvantes ya que se podría controlar respuestas inflamatorias excesivas.
- Considerando estos aspectos, el uso de estas nanopartículas en el desarrollo de vacunas es prometedor, puesto que cumple con 3 supuestos esperados: elevación de la respuesta humoral, prolongación de la producción de anticuerpos y modulación de la respuesta inflamatoria.
- Por otra parte, el trabajo desarrollado con la proteína M recombinante (rM) del SARS-CoV-2, pese a no lograr incorporarla en el complejo, pudo ser expresada, permitiendo tener un panorama de como continuar con el trabajo y de evaluar las distintas estrategias disponibles para lograr un óptimo rendimiento de expresión y así poder aprovechar las capacidades que la proteína ofrece.

10. REFERENCIAS

1. Abdellatif, A. A. H., Younis, M. A., Alsowinea, A. F., Abdallah, E. M., Abdel-Bakky, M. S., Al-Subaiyel, A., Hassan, Y. A. H., & Tawfeek, H. M. (2023). Lipid nanoparticles technology in vaccines: Shaping the future of prophylactic medicine. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 222, 113111. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.113111>
2. Alharbi, S. N., & Alrefaei, A. F. (2021). Comparison of the SARS-CoV-2 (2019-nCoV) M protein with its counterparts of SARS-CoV and MERS-CoV species. *Journal of King Saud University – Science*. 33(2).
3. Artika, I. M., Dewantari, A. K., & Wiyatno, A. (2020). Molecular biology of coronaviruses: Current knowledge. *Heliyon*. 6(8).
4. Batista, C. M., & Foti, L. (2021). Anti-SARS-CoV-2 and anti-cytokine storm neutralizing antibody therapies against COVID-19: Update, challenges, and perspectives. *International Immunopharmacology*. 99.
5. Bentacur B., Jiménez D., Linares B. (2012). Potencial Zeta (ζ) como criterio de optimización de dosificación de coagulante en planta de tratamiento de agua potable. *Dyna*. 79(175). Pp.: 166-172.
6. Bianchi, M., Benvenuto, D., Giovanetti, M., Angeletti, S., Ciccozzi, M., & Pascarella, S. (2020). Sars-CoV-2 Envelope and Membrane Proteins: Structural Differences Linked to Virus Characteristics? *BioMed Research International*. 2020. Pp.: 1-6.

7. Burnette W.N. (1991). Recombinant subunit vaccines. *Curren Opinion in Biotechnology*. 2. Pp.: 882-892.
8. Cao, B., Xu, H., Mao, C. (2011). Transmission Electron Microscopy as a Tool to Image Bio-Inorganic Nanohybrids: The Case of Phage-Gold Nanocomposites. *Microscopy Research & Technique*. 74(7). 627-635.
9. Chen, X., Zhu, Y., Li, Q., Lu, G., Li, C., Jin, R., Li, L., Xu, B., Gao, L., Yin, J., & Xie, Z. (2022). Genetic characteristics of human coronavirus HKU1 in mainland China during 2018. *Archives of virology*, 167(11), 2173–2180. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05541-4>
10. Chen, Y., Zhang, Z., Li, J., Gao, Y., Zhou, L., Ge, X., Han, J., Guo, X., & Yang, H. (2018). Porcine epidemic diarrhea virus S1 protein is the critical inducer of apoptosis. *Virology Journal*. 15(1). 170.
11. Chung, J. Y., Thone, M. N., & Kwon, Y. J. (2021). COVID-19 vaccines: The status and perspectives in delivery points of view. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 170. 1-25.
12. Colina S.E., Serena M.S., Echeverría M.S., Metz G. E. (2021). Clinical and molecular aspects of veterinary coronaviruses. *Virus Research*. 297.
13. Copland, M. J., Rades, T., & Davies, N. M. (2000). Hydration of lipid films with an aqueous solution of Quil A: A simple method for the preparation of immune-stimulating complexes. *International Journal of Pharmaceutics*, 196(2), 135-139.
14. Demana, P. H., Davies, N. M., Hook, S., & Rades, T. (2005). Quil A–lipid powder formulations releasing ISCOMs and related colloidal structures upon hydration. *Journal of Controlled Release*, 103(1), Pp.:45-59.

15. Dingermann T. (2007). Recombinant therapeutic proteins: Production platforms and challenges. *Biotechnology Journal*. 3. Pp: 90-97.
16. Esquivel G. (2020). Los impactos económicos de la pandemia en México. *Economía UNAM*. 17(51).
17. Fu, Y.-Z., Wang, S.-Y., Zheng, Z.-Q., Yi Huang, Li, W.-W., Xu, Z.-S., & Wang, Y.-Y. (2021). SARS-CoV-2 membrane glycoprotein M antagonizes the MAVS-mediated innate antiviral response. *Cellular & Molecular Immunology*. 18(3). Pp.: 613-620.
18. García J., Santana Z., Zumalacárregui L., Quintana M., González D., Furrázola G. (2013). Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *VacciMonitor*. 22(2). Pp.: 30-39.
19. García-González, E., Cerriteño-Sánchez, J. L., Cuevas-Romero, J. S., García-Cambrón, J. B., Castañeda-Montes, F. J., & Villaseñor-Ortega, F. (2023). Seroepidemiology study of porcine epidemic diarrhea virus in Mexico by indirect enzyme-linked immunosorbent assay based on a recombinant fragment of N-terminus domain spike protein. *Microorganisms*, 11(7), 1843. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071843>
20. Hartenian, E., Nandakumar, D., Lari, A., Ly, M., Tucker, J. M., & Glaunsinger, B. A. (2020). The molecular virology of coronaviruses. *Journal of Biological Chemistry*. 295(37). Pp.: 12910-12934.
21. Hasöksüz, M., Kiliç, S., & Saraç, F. (2020). Coronaviruses and SARS-COV-2. *Turkish journal of medical sciences*, 50(SI-1), 549–556. <https://doi.org/10.3906/sag-2004-127>

22. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. (2020). Porcicultores de México replantean estrategias para impulsar el consumo de proteína animal por coronavirus. Visto: 10 de febrero de 2023. <https://www.iica.int/en/node/22119>
23. Jin, Z., Gao, S., Cui, X., Sun, D., & Zhao, K. (2019). Adjuvants and delivery systems based on polymeric nanoparticles for mucosal vaccines. *International Journal of Pharmaceutics*. 572.
24. Jung K., Saif L.J., Wang Q. (2020). Porcine epidemic diarrhea virus (VDEP): An update on etiology transmission, pathogenesis, and prevention and control. *Virus Research*. 286.
25. Kaur, J., Kumar, A., & Kaur, J. (2018). Strategies for optimization of heterologous protein expression in E. coli: Roadblocks and reinforcements. *International Journal of Biological Macromolecules*. 106. Pp.: 803-822.
26. Kheirollahpour, M., Mehrabi, M., Dounighi, N. M., Mohammadi, M., & Masoudi, A. (2020). Nanoparticles and Vaccine Development. *Pharmaceutical Nanotechnology*. 8(1). Pp.: 6-21.
27. Kim, S.-H., Cho, B.-H., Lee, K.-Y., & Jang, Y.-S. (2018). N-terminal Domain of the Spike Protein of Porcine Epidemic Diarrhea Virus as a New Candidate Molecule for a Mucosal Vaccine. *Immune Network*. 18(3).
28. Kirtipal, N., Bharadwaj, S., & Kang, S. G. (2020). From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infection, Genetics and Evolution*. 85.

29. Lam Cabanillas, E. R., León Risco, A. O., León Risco, K. B., Llamas Hoyos, G. L., López Zavaleta, R. M., Luzuriaga Tirado, E. del R., Mendoza Blas, A. M., & Huamán Saavedra, J. J. (2021). Molecular basis of COVID-19 pathogenesis and in silico studies of potential pharmacological treatment. *Revista de la Facultad de Medicina Humana*. 21(2). Pp.: 417-432.
30. Lara A. R. (2011). Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 10(2). Pp.: 209-223.
31. Lara-Romero, R., Gómez-Núñez, L., Cerriteño-Sánchez, J. L., Márquez-Valdelamar, L., Mendoza-Elvira, S., Ramírez-Mendoza, H., & Rivera-Benítez, J. F. (2018). Molecular characterization of the spike gene of the porcine epidemic diarrhea virus in Mexico, 2013–2016. *Virus Genes*, 54(2), 215-224.
32. Lara-Romero, R., Cerriteño-Sánchez, J. L., Mendoza-Elvira, S., García-Cambrón, J. B., Castañeda-Montes, M. A., Pérez-Aguilar, J. M., & Cuevas-Romero, J. S. (2022). Development of Novel Recombinant Antigens of Nucleoprotein and Matrix Proteins of Porcine orthorubulavirus: Antigenicity and Structural Prediction. *Viruses*, 14(9), 1946.
33. Lee, C. (2015). Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virology Journal*. 12(1). 193.
34. Li, W., Li, H., Liu, Y., Pan, Y., Deng, F., Song, Y., Tang, X., & He, Q. (2012). New Variants of Porcine Epidemic Diarrhea Virus, China, 2011. *Emerging Infectious Diseases*. 18(8). Pp.: 1350-1353.

35. Li, W., van Kuppeveld, F. J. M., He, Q., Rottier, P. J. M., & Bosch, B.-J. (2016). Cellular entry of the porcine epidemic diarrhea virus. *Virus Research*. 226. Pp.: 117-127.
36. Li, Z. (2020). Porcine epidemic diarrhea virus: Molecular mechanisms of attenuation and vaccines. *Microbial Pathogenesis*, 13.
37. Li, Z., Ma, Z., Li, Y., Gao, S., & Xiao, S. (2020). Porcine epidemic diarrhea virus: Molecular mechanisms of attenuation and vaccines. *Microbial Pathogenesis*. 149. 104553.
38. Liu, T., Zhu, W., Han, C., Sui, X., Liu, C., Ma, X., & Dong, Y. (2018). Preparation of Glycyrrhetic Acid Liposomes Using Lyophilization Monophase Solution Method: Preformulation, Optimization, and In Vitro Evaluation. *Nanoscale Research Letters*, 13(1), 324.
39. Liu, L., Wang, X., Mao, R., Zhou, Y., Yin, J., Sun, Y., & Yin, X. (2021). Research progress on live attenuated vaccine against African swine fever virus. *Microbial Pathogenesis*. 158.
40. Liu, Qiang, y Volker Gerdt. (2021). Transmissible Gastroenteritis Virus of Pigs and Porcine Epidemic Diarrhea Virus (Coronaviridae). Pp.: 850-53 en *Encyclopedia of Virology*. Elsevier.
41. Liu Z, Zhong JY, Gao EN, Yang H. (2014). Effects of glycyrrhizin acid and licorice flavonoids on LPS-induced cytokines expression in macrophage. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 39(19), Pp.:3841-3845. Chinese. PMID: 25612451.
42. Lopandić, Z., Protić-Rosić, I., Todorović, A., Glamočlija, S., Gnjatović, M., Čujic, D., & Gavrović-Jankulović, M. (2021). IgM and IgG Immunoreactivity of SARS-

- CoV-2 Recombinant M Protein. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(9).
43. Lopez-Castejon, G., & Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 22(4), Pp.: 189-195.
44. López-Hoyos M., Fernández-Fresnedo G., López-Escribano H., de Francisco A.L.M. (2003). Antigenicidad de las proteínas recombinantes. *Gaceta Médica de Bilbao*. 100. Pp.: 17-21.
45. Lv, C., Xiao, Y., Li, X. & Tian, K. (2016). Porcine epidemic diarrhea virus: Current insights. *Virus Adaptation and Treatment*, 1.
46. Mahtarin, R., Islam, S., Islam, Md. J., Ullah, M. O., Ali, M. A., & Halim, M. A. (2022). Structure and dynamics of membrane protein in SARS-CoV-2. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 40(10). Pp.: 4725-4738.
47. Martínez-Mateo, P., Bustos-Fonseca, M. J., & Gil-Díaz, M. J. (2012). Actualización en vacunas. Teoría, realidades y mitos (I). *SEMERGEN - Medicina de Familia*. 38(3). Pp.: 160-166.
48. Matsuoka, K., Miyajima, R., Ishida, Y., Karasawa, S., & Yoshimura, T. (2016). Aggregate formation of glycyrrhizic acid. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 500. Pp.: 112-117.
49. Miguel-Hernández, Á. S., & Ramos-Sánchez, M. ^a C. (2012). *Historia de las vacunas y sueroterapia*. 7.
50. Mistry, P., Barmania, F., Mellet, J., Peta, K., Strydom, A., Viljoen, I. M., James, W., Gordon, S., & Pepper, M. S. (2022). SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and

- Host Immunity. *Frontiers in Immunology*, 12, 809244.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.809244>
51. Nakamura, T., Kawai, M., Sato, Y., Maeki, M., Tokeshi, M., & Harashima, H. (2020). The Effect of Size and Charge of Lipid Nanoparticles Prepared by Microfluidic Mixing on Their Lymph Node Transitivity and Distribution. *Molecular Pharmaceutics*, 17(3), 944-953.
<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b01182>
52. Naqvi, A. A. T., Fatima, K., Mohammad, T., Fatima, U., Singh, I. K., Singh, A., Atif, S. M., Hariprasad, G., Hasan, G. M., & Hassan, Md. I. (2020). Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 1866(10).
53. Noman, Ali, Muhammad Aqeel, Noreen Khalid, Mohamed Hashem, Saad Alamari, Saad Zafar, Muhammad Qasim, Muhammad Kashif Irshad, y Sameer H. Qari. (2021). Spike Glycoproteins: Their Significance for Corona Viruses and Receptor Binding Activities for Pathogenesis and Viral Survival. *Microbial Pathogenesis*. 150.
54. Norma Oficial Mexicana. (6 de diciembre de 1999). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. [NOM-062ZOO-1999]. Gaceta Oficial de la Federación, México.
55. Overton T. W. (2014). Recombinant protein production in bacterial host. *Drug Discovery Today*. 19(5).

56. Organización Mundial de la Salud Animal. (2014). Infección por el virus de la diarrea epidémica porcina. Visto: 10 de enero de 2023. https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Our_scientific_expertise/docs/pdf/E_factsheet_PEDV.pdf
57. Palacio-Mejía, L. S., Hernández-Ávila, J. E., Hernández-Ávila, M., Dyer-Leal, D., Barranco, A., Quezada-Sánchez, A. D., Alvarez-Aceves, M., Cortés-Alcalá, R., Fernández- Wheatley, J. L., Ordoñez-Hernández, I., Vielma-Orozco, E., Muradás-Troitiño, M. de la C., Muro-Orozco, O., Navarro-Luévano, E., Rodríguez-González, K., Gabastou, J. M., López-Ridaura, R., & López-Gatell, H. (2022). Leading causes of excess mortality in Mexico during the COVID-19 pandemic 2020–2021: A death certificates study in a middle-income country. *The Lancet Regional Health – Americas*. 13.
58. Pastorino, G., Cornara, L., Soares, S., Rodrigues, F., & Oliveira, M. B. P. P. (2018). Liquorice (*Glycyrrhiza glabra*): A phytochemical and pharmacological review: Liquorice (*Glycyrrhiza glabra*): A Review. *Phytotherapy Research*. 32(12). Pp.: 2323-2339.
59. Payne, S. (2017). Viral Vaccines. *Viruses* Pp.: 73-79. Elsevier.
60. Payne, S. (2017). Immunity and Resistance to Viruses. *Viruses* Pp. 61-71. Elsevier.
61. Peng, M. (2020). Outbreak of COVID-19: An emerging global pandemic threat. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 129.

62. Piñeros, R., & Mogollón Galvis, J. D. (2015). Coronavirus en porcinos: Importancia y presentación del virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV) en Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, 29 (73).
63. Pollet, J., Chen, W.-H., & Strych, U. (2021). Recombinant protein vaccines, a proven approach against coronavirus pandemics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 170, 71-82. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.01.001>
64. Quezada, A. (2020). Los orígenes de la vacuna. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 31(3). Pp.: 367-373.
65. Rabaan, A. A., Al-Ahmed, S. H., Haque, S., Sah, R., Tiwari, R., Malik, Y. S., Dhama, K., Yatoo, M. I., Bonilla-Aldana, D. K., & Rodriguez-Morales, A. J. (2020). SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV: a comparative overview. *Le Infezioni in Medicina*. 11.
66. Rajcani J. (2020). Coronaviruses. *Acta Viroológica*. 65. Pp.: 264-267.
67. Raphael, T. J., & Kuttan, G. (2003). Effect of naturally occurring triterpenoids glycyrrhizic acid, ursolic acid, oleanolic acid and nomilin on the immune system. *Phytomedicine*, 10(6-7), 483-489. <https://doi.org/10.1078/094471103322331421>
68. Reed, S. G., Tomai, M., & Gale, M. J. (2020). New horizons in adjuvants for vaccine development. *Current Opinion in Immunology*. 65. Pp.: 97-101.
69. Rice, B. L. (2021). Why are there so few (or so many) circulating coronaviruses? *Trends in Immunology*, 13.

70. Richard, S. A. (2021). Exploring the Pivotal Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Potentials of Glycyrrhizic and Glycyrrhetic Acids. *Mediators of Inflammation*. 2021. 1-15.
71. Satarker, S., & Nampoothiri, M. (2020). Structural Proteins in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2. *Archives of Medical Research*. 51(6). Pp.: 482-491.
72. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (4 de mayo de 2020). Se estima para 2020 una producción de 1.7 millones de toneladas de carne de porcino: Agricultura. gob.mx. <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/se-estima-para-2020-una-produccion-de-1-7-millones-de-toneladas-de-carne-de-porcino-agricultura>
73. Selyutina, O. Yu., & Polyakov, N. E. (2019). Glycyrrhizic acid as a multifunctional drug carrier – From physicochemical properties to biomedical applications: A modern insight on the ancient drug. *International Journal of Pharmaceutics*. 559. Pp.: 271-279.
74. Shah, R. R., O'Hagan, D. T., Amiji, M. M., & Brito, L. A. (2014). The impact of size on particulate vaccine adjuvants. *Nanomedicine*. 9(17). Pp.: 2671-2681.
75. Sharma, A., Ahmad Farouk, I., & Lal, S. K. (2021). COVID-19: A Review on the Novel Coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention. *Viruses*, 13(2), 202.
76. Soler E. and Houdebine L.-M. (2007). Preparation of recombinant vaccines. *Biotechnology Annual Review*. 13.

77. Sun, H.-X., Xie, Y., & Ye, Y.-P. (2009). ISCOMs and ISCOMATRIX™. *Vaccine*. 27(33). Pp.: 4388-4401.
78. Tang, G., Liu, Z., & Chen, D. (2022). Human coronaviruses: Origin, host and receptor. *Journal of Clinical Virology*. 155.
79. Thakur, A., & Foged, C. (2020). Nanoparticles for mucosal vaccine delivery. En *Nanoengineered Biomaterials for Advanced Drug Delivery*. Pp.: 603-646. Elsevier.
80. Tsakiri M., Naziris N., Demetzos C. (2021). Innovative vaccines platforms against infectious diseases: Under the scope of the COVID-19 pandemic. *International Journal of Pharmaceutics*. 610.
81. Ura, T., Okuda, K., & Shimada, M. (2014). Developments in Viral Vector-Based Vaccines. *Vaccines*. 2(3). Pp.: 624-641.
82. Urbán-Morlán M. Z. (2015). Evaluación de la actividad terapéutica del ácido glicirricínico formulado en sistemas submicrónicos contra el virus del PRRS. UNAM. Tesis.
83. Urbán-Morlán Z, Ganem-Rondero A, Melgoza-Contreras LM, Escobar-Chávez JJ, Nava-Arzaluz MG, Quintanar-Guerrero D. (2010). Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing cyclosporine by the emulsification-diffusion method. *International Journal of Nanomedicine*. 5, 611-620. doi: 10.2147/IJN.S12125.
84. Wang E., Vlasova A.N., Kenney S.P., Saif L.J. (2019). Emerging and re-emerging coronaviruses in pigs. *Current Opinion in Virology*. 34, 39-49.

85. Wang, K., Lu, W., Chen, J., Xie, S., Shi, H., Hsu, H., Yu, W., Xu, K., Bian, C., Fischer, W. B., Schwarz, W., Feng, L., & Sun, B. (2012). PEDV ORF3 encodes an ion channel protein and regulates virus production. *FEBS Letters*. 586(4), 384-391.
86. Wang, M.-Y., Zhao, R., Gao, L.-J., Gao, X.-F., Wang, D.-P., & Cao, J.-M. (2020). SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10.
87. Yadav, T., Srivastava, N., Mishra, G., Dhama, K., Kumar, S., Puri, B., & Saxena, S. K. (2020). Recombinant vaccines for COVID-19. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 16(12). Pp.: 2905-2912.
88. Yadav, T., Srivastava, N., Mishra, G., Dhama, K., Kumar, S., Puri, B., & Saxena, S. K. (2020). Recombinant vaccines for COVID-19. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 16(12). Pp.: 2905-2912.
89. Yan, Q., Liu, X., Sun, Y., Zeng, W., Li, Y., Zhao, F., Wu, K., Fan, S., Zhao, M., Chen, J., & Yi, L. (2022). Swine Enteric Coronavirus: Diverse Pathogen-Host Interactions. *International journal of molecular sciences*, 23(7), 3953. <https://doi.org/10.3390/ijms23073953>
90. Yu, J.-Y., Ha, J., Kim, K.-M., Jung, Y.-S., Jung, J.-C., & Oh, S. (2015). Anti-Inflammatory Activities of Licorice Extract and Its Active Compounds, Glycyrrhizic Acid, Liquiritin and Liquiritigenin, in BV2 Cells and Mice Liver. *Molecules*, 20(7), 13041-13054. <https://doi.org/10.3390/molecules200713041>

91. Zhao, X., Fan, Y., Wang, D., Hu, Y., Guo, L., Ruan, S., Zhang, J., & Yuan, J. (2011). Immunological adjuvant efficacy of glycyrrhetic acid liposome against Newcastle disease vaccine. *Vaccine*. 29(52). Pp.: 9611-9617.

11. ANEXOS

11.1. Congresos presentados durante el desarrollo de este proyecto

- Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI) – Curso Teórico-Virtual “Estrategias para el diseño y producción de Proteínas Recombinantes de agentes virales de interés pecuario” (3 al 5 de agosto de 2021). *“Producción de proteínas recombinantes de Coronavirus”*. Conferencista.
- XII Congreso Nacional de Virología (29/09/2021-2/10/2021). Recombinant expression system for SARS-CoV-2 membrane (M) protein. Presentación oral.
- Tecnológico Nacional de México en Celaya – XXVII Jornada de Ingeniería Bioquímica (18/10/2021-22/10/2021). *“Producción de proteínas recombinantes de Coronavirus”*. Conferencia oral.
- Reuniones Nacionales de Investigación e Innovación Pecuaria, Agrícola, Forestal y Acuícola Pesquera - INIFAP (10/11/2021-12/11/2021). *“Construcción del primer sistema de expresión de la proteína de membrana (M) de SARS-CoV-2”*. Presentación oral.
- Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI) – “Curso Teórico Internacional: Aplicación de herramientas Biotecnológicas en Medicina Veterinaria” (06/09/2022-08/09/2022). Conferencista.

- Agroevento “Microorganismos en la producción agropecuaria de México” – INIFAP (23/9/2022). *“Uso de un sistema procarionte para el desarrollo de un biológico con capacidad inmunogénica acoplado a liposomas como adyuvante”*. Resumen técnico área Pecuaria.
- Universidad Autónoma del Estado de México – 5to. Foro Interdisciplinario de Investigación Científica 2022 (15 y 16 de noviembre del 2022). *“Desarrollo de un complejo con capacidad inmunogénica compuesto con liposomas con ácido glicirricínico acoplados a una proteína recombinante viral de interés pecuario”*. Presentación oral.
- CENID-Salud Animal e Inocuidad – “Curso Taller Práctico: Aplicación de Herramientas Biotecnológicas en Medicina Veterinaria” (07/03/2023-10/03/2023). Conferencista-Instructor.

11.2. Artículos publicados durante la maestría



viruses



Article

Development of Novel Recombinant Antigens of Nucleoprotein and Matrix Proteins of *Porcine orthorubulavirus*: Antigenicity and Structural Prediction

Rocío Lara-Romero ^{1,2}, José Luis Cerriteno-Sánchez ¹, Susana Mendoza-Elvira ² , José Bryan García-Cambrón ³, María Azucena Castañeda-Montes ^{1,2}, José Manuel Pérez-Aguilar ⁴ and Julieta Sandra Cuevas-Romero ^{1,*}

¹ Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km 15.5 Carretera México-Toluca, Palo Alto, Cuajimalpa, Ciudad de México 05110, Mexico

² Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Estado de México, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico

³ Maestría en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Ciudad de México 09089, Mexico

⁴ Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla 72000, Mexico

* Correspondence: cuevasjulieta@iniifap.gob.mx; Tel.: +52-(55)-38718700 (ext. 80312)



Citation: Lara-Romero, R.; Cerriteno-Sánchez, J.L.; Mendoza-Elvira, S.; García-Cambrón, J.B.; Castañeda-Montes, M.A.; Pérez-Aguilar, J.M.; Cuevas-Romero, J.S. Development of Novel Recombinant Antigens of Nucleoprotein and Matrix Proteins of *Porcine orthorubulavirus*: Antigenicity and Structural Prediction. *Viruses* **2022**, *14*, 1946. <https://doi.org/10.3390/v14091946>

Academic Editors:
Lillianne Ganges and Jishu Shi

Received: 22 July 2022

Accepted: 30 August 2022

Published: 1 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Blue eye disease (BED) is a swine viral infection that affects the pork industry of Mexico. *Porcine orthorubulavirus* (PRV) is the etiological agent, and the hemagglutinin-neuraminidase protein (HN) is characterized as the best antigen for serological tests, although other structural proteins, including the nucleoprotein (NP) and the matrix (M) protein, have been investigated during the infection of members of the *Paramyxoviridae* family, generating promising results. Herein, for the first time, we successfully produced and characterized both the NP and M proteins of PRV by using a recombinant strategy in the *E. coli* heterologous system. The ORF of the NP and M genes were cloned in-frame with the pET-SUMO expression vector. Recombinant proteins proved to be a sensitive target to detect seroconversion at 7 days until 28 days in vaccinated mice (BALB/c) by indirect ELISAs. Immunoreactivity was also tested using porcine serum samples, in which antibodies were recognized from early stages to a persistence of PRV infection, which is indicative that these proteins contain properties similar to native antigens. The predicted tertiary structure showed that both proteins have a conserved structure that resembles those found in others *Paramyxovirus*. Our results pave the way for developing biotechnological tools based on these proteins for the control and prevention of BED.

Keywords: *Porcine orthorubulavirus*; matrix protein; nucleoprotein; recombinant protein; *E. coli*

1. Introduction

Porcine orthorubulavirus, La Piedad Michoacán Mexico Virus (PRV-LPMV) [1], previously named *Porcine Rubulavirus*, is the etiological agent of blue eye disease (BED) in pigs. Similarly to other rubulaviruses, the genomic structure of PRV contains a single promoter in the untranslated 3' region, which is followed by the NP, P, M, F, HN, and L open reading frames (ORFs) that code for 10 proteins with structural, regulatory, and enzymatic functions [2]. The virion consists of a lipid bilayer or outer surface envelope derived from the plasma membrane of the host cell. Inserted into this bilayer are two glycoproteins: the fusion (F) and the hemagglutinin/neuraminidase (HN) [3,4]. Positioned right under the envelope is the matrix (M) protein, which is associated with part of the glycoproteins and the nucleocapsid. The nucleocapsid consists of a nonsegmented negative-sense single-stranded genomic RNA (approximately 15,000 nucleotides) that is tightly encapsulated by the nucleoprotein (NP). The P gene has the capacity to encode four possible polypeptides, namely, P, V, C, and I, from the same gene via editing and the alternative initiation of translation [5–7].

REGULAR PAPER

Small ruminant lentivirus capsid protein (SRLV-p25) antigenic structural prediction and immunogenicity to recombinant SRLV-rp25-coupled to immunostimulatory complexes based on glycyrrhizinic acid

María Azucena Castañeda-Montes,¹ Julieta Sandra Cuevas-Romero,^{2,*} José Luis Cerriteño-Sánchez,² Lucero de María Ávila-De la Vega,¹ José Bryan García-Cambrón,² and Hugo Ramírez-Álvarez ^{1,*}

¹Virology, Genetics, and Molecular Biology Laboratory. Faculty of Higher Education, Cuautitlán, Veterinary Medicine, Campus 4. National Autonomous University of Mexico. Km. 2.5 ctra. Cuautitlán-Teoloyucan, San Sebastián Xhala. Cuautitlán Izcalli Estado de México, México; and ²Laboratorio de Virología, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI), INIFAP, KM. 15.5 Carretera México-Toluca, Col. Cuajimalpa, Ciudad de México, México

*Correspondence: Hugo Ramírez Álvarez, ramirah@unam.mx; Julieta Sandra Cuevas Romero, scuevas16@gmail.com

ABSTRACT

Small ruminant lentiviruses (SRLV) infect sheep and goats resulting in significant economic losses. This study evaluated for the first time the predicted conformational structure of the SRLV-capsid-protein 25 (SRLV-p25) and analyzed the antigenicity of recombinant protein (SRLV-rp25) in mice by coupling to an immunostimulatory complexes based on glycyrrhizinic acid liposomes (GAL) and tested plasma from goats and sheep naturally infected. Analysis *in silico* and conformational structure of SRLV-p25 (genotype B-FESC-752) showed similar characteristics to other lentiviral capsids. The efficient expression of SRLV-rp25 was confirmed by Western blot. The humoral immune responses in mice showed an increased level of antibodies from day 21 to 35 of the SRLV-rp25-GAL and SRLV-rp25-ISCOM® groups and the cellular immune response showed no significant difference in IL-10 levels ($P > .05$), however, a significant difference ($P < .001$) was observed when comparing SRLV-rp25-GAL with SRLV-rp25 groups. Immunoreactivity toward SRLV-rp25 revealed 61% of positive samples from naturally infected goats and sheep.

Received: 28 October 2022; Accepted: 5 December 2022

© The Author(s) 2022. Published by Oxford University Press on behalf of Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com



Article

Seroepidemiology Study of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in Mexico by Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on a Recombinant Fragment of N-Terminus Domain Spike Protein

Eduardo García-González ¹, José Luis Cerriteño-Sánchez ^{2,*}, Julieta Sandra Cuevas-Romero ², José Bryan García-Cambrón ³, Francisco Jesus Castañeda-Montes ⁴ and Francisco Villaseñor-Ortega ^{1,5,*}

¹ Programa de Doctorado en Ciencias de la Ingeniería, Tecnológico Nacional de México en Celaya, Celaya 38010, Guanajuato, Mexico

² Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, INIFAP, Mexico City 05110, Mexico

³ Programa de Maestría en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Mexico City 09340, Mexico

⁴ Programa de Estancias Posdoctorales por México para la Formación y Consolidación de las y los Investigadores por México, CONAHCYT, Mexico City 03940, Mexico

⁵ Tecnológico Nacional de México en Celaya, Departamento de Ingeniería Bioquímica, Antonio García Cubas Pte #600 esq. Av. Tecnológico, Celaya 38010, Guanajuato, Mexico

* Correspondence: cerritenos.jose@inifap.gob.mx (J.L.C.-S.); francisco.villaseñor@itcelaya.edu.mx (F.V.-O.); Tel.: +52-(55)-3871-8700 (ext. 80388) (J.L.C.-S.); +52-(461)-611-7575 (ext. 6485) (F.V.-O.)



Citation: García-González, E.; Cerriteño-Sánchez, J.L.; Cuevas-Romero, J.S.; García-Cambrón, J.B.; Castañeda-Montes, F.J.; Villaseñor-Ortega, F. Seroepidemiology Study of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in Mexico by Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on a Recombinant Fragment of N-Terminus Domain Spike Protein. *Microorganisms* **2023**, *11*, 1843. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071843>

Academic Editor: Shujie Wang

Received: 20 June 2023

Revised: 11 July 2023

Accepted: 17 July 2023

Published: 20 July 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Porcine epidemic diarrhea (PED) is an intestinal disease caused by the porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) and affects Mexico's swine industry. Despite the disease initially being described in Mexico in 2013, there has been no research into the virus's seroepidemiology carried out in Mexico. Thus, the goal of this study was to develop an indirect ELISA (iELISA) based on a recombinant N-terminal domain truncated spike (S) protein (rNTD-S) of PEDV to evaluate serum obtained from different pig-producing states in Mexico. A total of 1054 sera were collected from pig farms, slaughterhouses, and backyard production in the states of Aguascalientes, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Queretaro, Sinaloa, and Veracruz between 2019 and 2021. The rNTD-S protein was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells. Negative and positive serum samples used in the iELISA were previously tested by Western blot. According to our findings, 61.66% of the serum samples (650/1054) were positive, with Jalisco having the highest percentage of positive samples, at a rate of 21.44% (226/1054). This is the first seroepidemiology study of PEDV carried out in Mexico, revealing that the virus is still circulating since the initial outbreak; furthermore, it provides an overview of PEDV's spread and high level of persistence across the country's key swine-producing states.

Keywords: seroepidemiology; PEDV; iELISA; S protein

1. Introduction

Porcine epidemic diarrhea (PED) is a highly contagious infectious intestinal disease that is caused by the porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). The disease is characterized by severe diarrhea, vomiting, and dehydration. PEDV infections can occur in pigs of all ages and are the most serious in piglets, with morbidity and mortality rates often reaching 100% and was first reported in Belgium in 1978 [1,2]. In Europe, the virus spread until the end of the 1990s [3–5] and is currently spreading throughout Southern Italy [6]. PEDV was found for the first time in the USA in 2013, and the causative agent had a high identity (99%) with Chinese strains isolated in 2012 [7,8] and PEDV has been considered endemic in USA ever since [9–11]. In Mexico, the National Health, Food Safety, and Food Quality

11.3. Cronograma de desarrollo del proyecto

	Trimestre Durante el Segundo Año de la Maestría								
Descripción de Actividades	1			2			3		
Mes:	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1.-Cursar Temas selectos de biología experimental (I, II y III)	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2.-Desarrollar y caracterizar el complejo de nanopartículas con GA acopladas con proteínas recombinantes	X	X	X						
3.-Inoculación del complejo inmunoestimulante en un modelo murino			X	X					
4.-Evaluación de la respuesta inmune humoral (producción de anticuerpos)				X	X	X			
5.-Análisis de la respuesta inmune celular (concentración de citocinas)				X	X	X			
6.-Análisis de datos							X	X	X
7.-Revisión de literatura	X	X	X	X	X	X	X	X	X
8.-Escritura de tesis	X	X	X	X	X	X	X	X	X

11.4. Declaración de originalidad

Declaración de originalidad

El que suscribe José Bryan García Cambrón, alumno del posgrado en Biología Experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: "Evaluación inmunológica de un complejo inmunoestimulante a base de nanopartículas lipídicas con ácido glicirricínico (GA) acoplado a proteínas recombinantes de Coronavirus (Alphacoronavirus y Betacoronavirus)",

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante la comisión del posgrado en Biología Experimental, a los miembros del comité de tutores, así como también a los miembros del honorable jurado para la obtención del grado de Maestro en Biología Experimental es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 23 de agosto del 2023.

Atentamente



José Bryan García Cambrón



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00251

Matrícula: 2212801166

Evaluación inmunológica de un complejo inmunoestimulante a base de nanopartículas lipídicas con ácido glicirricínico (GA) acoplado a proteínas recombinantes de Coronavirus (Alphacoronavirus y Betacoronavirus).

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 11 del mes de septiembre del año 2023 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ
DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ
DR. MOISES VERGARA MENDOZA
DR. JOSE LUIS CERRITEÑO SANCHEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: JOSE BRYAN GARCIA CAMBRON

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



JOSE BRYAN GARCIA CAMBRON
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ

VOCAL

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

VOCAL

DR. MOISES VERGARA MENDOZA

SECRETARIO

DR. JOSE LUIS CERRITEÑO SANCHEZ