



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Caracterización molecular e inmunológica de transformantes de
Chlamydomonas reinhardtii que contienen un péptido antiviral y
una proteína antigénica contra el virus de la influenza A H1N1**

Tesis que presenta

Karen Lizbeth Reyes Barrera

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

Dra. Ruth Elena Soria Guerra

San Luis Potosí, S.L.P., 30 de Septiembre del 2021



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Caracterización molecular e inmunológica de transformantes de *Chlamydomonas reinhardtii* que contienen una proteína antigénica y un péptido antiviral contra el virus de la influenza A H1N1**” presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Karen Lizbeth Reyes Barrera** y aprobada el **día 18 de septiembre del 2021** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Codirector de la tesis

Dra. Ruth Elena Soria Guerra
Codirector de la tesis

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
Miembro del Comité Tutorial

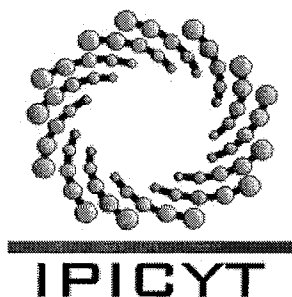
Dr. Samuel Lara González
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., y en el Laboratorio de Biotecnología Molecular de Células Vegetales de la UASLP, bajo la codirección de los Dres. Ángel Gabriel Alpuche Solís y Ruth Elena Soria Guerra.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 331786) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C., se contó con los apoyos de los proyectos de Ciencia Básica CONACYT 56980, del Fideicomiso CEEPAC-SLP 18397 y Fondos Propios de LANBAMA.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 125 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 30 días del mes de septiembre del año 2021, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa	Presidenta	IPICYT
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Secretario	IPICYT
Dra. Ruth Elena Soria Guerra	Sinodal externo	UASLP
Dr. Samuel Lara González	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Karen Lizbeth Reyes Barrera

sobre la Tesis intitulada:

Caracterización molecular e inmunológica de transformantes de Chlamydomonas reinhardtii que contienen un péptido antiviral y una proteína antigénica contra el virus de la influenza A H1N1

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Dra. Ruth Elena Soria Guerra (UASLP)

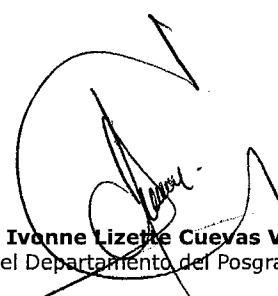
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 18:05 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 30 días del mes de septiembre de 2021.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dedicatorias

*A mis padres Eloy Reyes Maya y Esperanza Barrera Hernández por darme la vida,
el amor, la sabiduría y la confianza.*

*A mis hermanos Marco Polo, Edwin Mijaíl y Shorili por darme la felicidad e impulso
para poder superar las adversidades de la vida.*

A mis Hermanos de vida Alex, Aaron, Paez y Marce.

A Benjamín por su cariño y positividad.

A Stalin por darme motivos para vivir



Agradecimientos

Quiero agradecer al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís por darme su confianza, el apoyo incondicional y las herramientas para el desarrollo del proyecto. Sobre todo por su paciencia, consejos y amistad durante esta etapa de mi formación académica.

A la Dra. Ruth Elena Soria Guerra por la codirección del presente trabajo y por haberme brindado los conocimientos y enseñanzas que fueron el eje rector para la realización de presente proyecto y por haber sido mi mentora durante mi formación profesional.

Dra. Leonor Huerta Hernández, Dra. Nora Alma Fierro González y Dr. Rogelio López Martínez, por la oportunidad de ser parte de su grupo de investigación y un nuevo comienzo a mi vida.

A la Biol. Érica Segura por todo el apoyo y capacitación en el laboratorio BSL3 de Instituto de Biomédicas Básicas de la UNAM.

Al Dr. Samuel Lara González y Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa por sus valiosos comentarios, consejos a mi trabajo de tesis y su amistad brindada desde mi ingreso al IPICYT.

Al Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga por sus palabras y la inspiración como científico.

Al Q.F.B. Rosalba Castillo Collazo y al Biol. Salvador Ambríz Granados por todas las asistencias brindadas.

A mis compañeros del laboratorio de Biología Molecular de Plantas del IPICYT y el laboratorio de Biotecnología Molecular de Células Vegetales de la UASLP.

A la Sra. Rosita por ser el elemento esencial del laboratorio.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, por la oportunidad para continuar mis estudios.

Al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) por las facilidades otorgadas.

También agradezco profundamente al CONACYT por el financiamiento 331786 para la realización del presente trabajo.

Contenido

Título	Página
Constancia de aprobación de tesis	i
Créditos Institucionales	ii
Dedicatorias	iv
Agradecimientos	v
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Anexos	xi
Resumen	xii
Abstract	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Características del virus	3
2.2. Evolución del virus	6
2.3. Tratamientos	7
2.3.1. El uso de péptidos como estrategia antiviral	9
2.3.1.1. El péptido Entry Blocker como estrategia de inhibición del anclaje viral a la célula	10
2.4. Vacunas	10
2.4.1. Vacunas actuales	11
2.4.2. Nuevas plataformas de producción de vacunas	13
2.4.2.1 Cultivo celular	13
2.4.2.2. Bacterias como biofábricas de vacunas universales.	15
2.4.2.3. Planta	16
2.4.2.4. Otros sistemas de expresión	17
2.5. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	17
3 OBJETIVOS	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1. Péptido EB	21
4.1.1. Condiciones de crecimiento de la microalga	21
4.1.2. Diseño del péptido EB	21
4.1.3. Análisis por PCR de las microalgas transgénicas y transplastómicas	23
4.1.4. Extracción de proteína de las algas transgénicas y transplastómicas que producen el péptido EB.	23
4.1.5. Producción de anticuerpos para el péptido EB en ratones BALB/c	24
4.1.6. Purificación de anticuerpos contra el péptido EB	25
4.1.7. Detección y cuantificación del péptido EB en los extractos solubles de las microalgas transformadas	27
4.1.8. Ensayos de citotoxicidad de los extractos de algas que producen EB	28
4.1.9. Propagación de los stocks virales del virus de la influenza A H1N1	29

4.1.10.	Ensayo de hemaglutinación	29
4.1.11.	Determinación de las unidades formadoras de placa de los virus	30
4.1.12.	Determinación de las TCID ₅₀ (Dosis infectiva en cultivo celular 50)	31
4.1.13.	Determinación de la actividad inhibitoria de la fusión del péptido EB	32
4.1.14.	Determinación de la actividad inhibitoria de la replicación viral del péptido EB	32
4.2.	Transformación y expresión de la proteína antigénica en microalgas	34
4.2.1.	Diseño de la proteína antigénica	34
4.2.2.	Análisis por PCR de las microalgas transgénicas y transplastómicas	36
4.2.2.1.	Extracción de proteínas y Western Blot	36
4.3.	Expresión de la proteína antigénica en <i>E. coli</i>	38
4.3.1.	Expresión de las proteínas en <i>E. coli</i>	38
4.3.2.	Purificación de la proteína P.A mediante columna de afinidad a níquel	38
4.3.3.	Producción de anticuerpos contra P.A en ratones BALB/c	39
4.3.4.	Caracterización de los anticuerpos policlonales	40
4.3.5.	Ensayos de microneutralización del suero de los ratones inmunizados con la proteína P.A	41
5.	RESULTADOS	43
5.1.	Péptido EB	43
5.1.1.	Selección de transformantes de <i>C. reinhardtii</i> y detección de transgenes	43
5.1.2.	Producción del péptido EB en <i>C. reinhardtii</i> .	44
5.1.3.	Producción de anticuerpos para el péptido EB en ratones BALB/c.	46
5.1.4.	Ensayos de citotoxicidad en células MDCK.	47
5.1.5.	Determinación de la actividad inhibitoria de la fusión del virus del péptido EB.	48
5.1.6.	Propagación de los stocks virales del virus de la influenza A H1N1.	50
5.1.7.	Determinación de la actividad inhibitoria de la replicación viral del péptido EB.	52
5.2.	Proteína antigénica expresada en microalgas.	55
5.2.1	PCR de las transformantes de <i>C. reinhardtii</i>	55
5.2.2.	Western Blot de transformantes de <i>C. reinhardtii</i>	56
5.3.	Proteína antigénica expresada en <i>E. coli</i>	58
5.3.1.	Expresión y purificación de P.A en <i>E. coli</i> BL21	58
5.3.2.	Producción de anticuerpos policlonales en ratones BALB/c	59
5.3.3.	Análisis de especificidad del anticuerpo anti-P.A	63
5.3.4.	Capacidad neutralizante de los anticuerpos generados por la proteína P.A.	65

6. DISCUSIÓN	67
6.1. Rendimiento y actividad biológica del péptido EB producido en microalgas	68
6.2. Producción de una proteína antigénica vs influenza expresada en microalgas	72
6.3. Proteína antigénica expresada en E. coli y su respuesta inmune en ratones	
7. CONCLUSIONES	79
8. ANEXOS	81
9. REFERENCIAS	82

Lista de tablas

Título	Página
1. Genoma y proteínas del virus de la influenza A	5
2. Vacunas profilácticas licenciadas por la FDA	12
3. Inhibición de la hemaglutinación por el virus de la influenza promovida por el péptido EB.	50
4. Inhibición de la replicación viral por el péptido EB	54

Lista de figuras

Título	Página
1. Estructura del virus de la influenza A	4
2. Diseño del péptido EB y esquema de las construcciones para la transformación de <i>C. reinhardtii</i>	22
3. Diseño de la proteína antigénica contra influenza A H1N1	35
4. Ensayo de PCR para la detección del gen del péptido EB en microalgas transformadas en núcleo	43
5. Detección de una banda estimada de 3.4 kDa en microalgas transformadas, correspondiente al péptido EB.	45
6. Identificación de los anticuerpos producidos específicos al péptido EB	47
7. La viabilidad celular no se ve afectada por los extractos de alga que contiene EB	48
8. EB inhibe la unión de la hemaglutinina viral a su receptor	49
9. Titulación viral por ensayo de unidades formadoras de placas líticas (PFUs).	52
10. Efecto antiviral de EB expresado en microalgas y EB sintético.	53
11. Confirmación de la integración del transgén en líneas transgénicas y transplastómicas de microalgas	55
12. Detección de la proteína P.A en los extractos de proteína soluble total de las líneas transgénicas	56
13. Detección de la proteína P.A en los extractos de proteína soluble total de las líneas transplastómicas	57
14. Western Blot de la proteína antigénica producida en bacteria purificada y concentrada	59
15. Determinación del título de anticuerpos de los grupos experimentales.	61
16. Cuantificación de los subtipos de inmunoglobulinas de los sueros de los grupos experimentales	62
17. Evaluación de la producción de anticuerpos específicos contra P.A	64
18. Determinación de la capacidad neutralizante de inmunoglobulinas de los sueros de los grupos experimentales.	66

Anexos

Titulo	Página
1. Artículos publicados	81

Resumen

Caracterización molecular e inmunológica de transformantes de *Chlamydomonas reinhardtii* que contienen un péptido antiviral y una proteína antigénica contra el virus de la influenza A H1N1

La infección por el virus de la influenza es la mayor causa de las enfermedades respiratorias a nivel mundial. Actualmente la vacunación y el uso de antivirales son las principales estrategias para combatir este virus. La alta variación génica de este virus implica actualizar las vacunas cada año y requerir plataformas de producción de proteínas recombinantes más rápidas y económicas; dentro de ellas destaca el uso de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. En el presente trabajo se plantean dos estrategias para el control del virus de la influenza; la expresión de un péptido antiviral y la producción de una vacuna. El péptido antiviral bloqueador de entrada (EB), se expresó en *C. reinhardtii* y se determinó su actividad biológica. EB expresado en algas fue capaz de evitar la unión de la hemaglutinina viral con su receptor celular e inhibir la replicación viral de influenza pdm A/H1N1. El EB expresado en algas fue 32 veces más efectivo para evitar la entrada viral en comparación con el péptido EB sintético. Para la segunda estrategia, se generó la proteína antigénica (P.A) con epítomos relevantes del virus de la Influenza A H1N1. El gen codificante para la proteína P.A se integró al núcleo y al cloroplasto de la microalga. La proteína P.A en los extractos de las microalgas transformadas se detectó por SDS-PAGE y Western Blot. Adicionalmente se expresó y se purificó a la proteína recombinante P.A producida en *Escherichia coli* BL21, con ella se llevó a cabo un ensayo de inmunización en ratones BALB/c. El suero de los ratones inmunizados con P.A recombinante mostraron un título alto de las inmunoglobulinas IgG total, IgG1, IgG2a e IgA y bajo para IgE. Además, mostraron un título neutralizante de 1:4,000 en ensayos de microneutralización viral con la cepa de influenza pdm A/H1N1. En conclusión *C. reinhardtii* es una buena plataforma para la producción de proteínas terapéuticas y la proteína P.A es un prototipo vacunal prometedor al ser inmunogénica e inmunoprotectora.

PALABRAS CLAVE: Antiviral, microalga, vacuna multiepitopo, biofármacos, anticuerpos neutralizantes.

Abstract

Molecular and immunological characterization of *Chlamydomonas reinhardtii* transformants producing an antigenic protein of influenza virus A H1N1 and an antiviral peptide

Influenza virus infection is the principal cause of respiratory illness worldwide. Currently vaccination and antivirals are the main strategies to fight this virus. The high viral mutation rates involve updating vaccines every year and require more efficient and economical recombinant protein production platforms, an alternative is the use of *Chlamydomonas reinhardtii*. In this work, two strategies for the control of the influenza virus were proposed; the expression of an antiviral peptide and a vaccine development. The entry-blocker (EB) peptide was expressed in *C. reinhardtii* and its biological activity was determined. EB expressed in microalgae was able to prevent viral hemagglutinin binding with its cellular receptor and to inhibit influenza pdm A/H1N1 viral replication. EB expressed in algae was 32-fold more effective in preventing viral entry compared to synthetic EB. The second strategy was the production of an antigenic protein (P.A), which contains conserved antigenic epitopes from influenza virus A H1N1. The P.A gene was inserted into the nuclear and chloroplast microalgae genomes. The P.A from transformed microalgae extracts was visualized by Western Blot. Additionally, P.A was expressed and purified from *Escherichia coli* BL21, then an immunization trial was carried out in BALB/c mice. Serum from mice immunized with recombinant P.A. showed a high titer of total IgG, IgG1, IgG2a and IgA and low for IgE immunoglobulins. They also showed a 1:4,000 neutralizing titers in viral microneutralization trials versus influenza pdm A/H1N1. In conclusion *C. reinhardtii* is a good platform for the production of therapeutic proteins and P.A protein is a promising vaccine prototype, because it is immunogenic and immunoprotective.

KEY WORDS. Antiviral, microalgae, multi-epitope vaccine, biopharmaceuticals, neutralizing antibodies.

1. INTRODUCCIÓN

El virus de la influenza es una de las principales causas de las enfermedades respiratorias en el mundo. Cada año la Organización Mundial de la Salud a nivel mundial estima entre 290,000 y 650,000 muertes anuales, además de una alta morbilidad aunado a que muchos de los casos requieren hospitalización (Iuliano et al., 2018; WHO, 2019). Particularmente el virus de la influenza es considerado una amenaza de salud pública por su alta tasa de propagación, mutación y la capacidad de afectar a diferentes grupos de edades (Webby et al., 2013). Particularmente existen grupos de alto riesgo a complicaciones asociadas a este patógeno, dentro de ellos destacan adultos mayores, pacientes inmunocomprometidos, mujeres embarazadas, personas con complicaciones pulmonares y niños (Toots y Plemper, 2020) .

El ser humano, al ser uno de los mamíferos más abundantes en el planeta, está propenso a ser blanco de enfermedades. Los virus que afectan a las vías respiratorias son capaces de propagarse rápidamente causando grandes epidemias. Históricamente el virus de influenza ha estado produciendo pandemias frecuentemente. En 1918 la gripe española producida por el virus H1N1 con genes aviares fue catalogada como la más grave al producir la muerte de 50 millones de personas. Posteriormente, en 1957 en el este de Asia comenzó una nueva epidemia asociada a influenza A H2N2, esta pandemia “gripe asiática” produjo el deceso de 1.1 millones de personas en todo el mundo. La última pandemia del siglo XX fue en 1968, causada por el virus de influenza A H3N2, originada en Estados Unidos la cual llegó a causar la muerte de un millón de personas; particularmente esta cepa sigue circulando en la actualidad de manera estacional (Richt y Webby 2013; CDC, 2021).

A principios de abril del 2009 en México y Estados Unidos surgió una nueva cepa patógena del virus de la influenza A H1N1 pdm, la cual se expandió en 40 países debido a su fácil transmisión y nula inmunidad en la población humana. Por

tal motivo la OMS activó la alerta de pandemia a nivel 5 (Smith et al., 2009). El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) estimó que durante el primer año de esta pandemia murieron de 151,700 a 575,400 personas en todo el mundo (CDC, 2021). Particularmente esta cepa está conformada de segmentos génicos que no habían sido reportados en animales ni en humanos; tiempo después se determinó que estos segmentos pertenecen a linajes porcinos de Norteamérica y Eurasia. Actualmente este virus sigue circulando en la población de manera estacional; causando hospitalizaciones y muertes mundialmente (Garten et al., 2009; CDC, 2021).

La destrucción de hábitat, el cambio climático, así como el estilo de vida del humano ha propiciado el surgimiento de enfermedades emergentes y reemergentes, siendo los virus los que han causado los eventos más catastróficos, debido a que son capaces de replicarse en diversos hospederos, su alta tasa de mutación y el desarrollo de mecanismos de evasión a la respuesta inmune del hospedero. Dentro de estos virus destacan los virus de RNA, porque sus polimerasas virales pocas veces hacen corrección de errores; particularmente el virus de la influenza tiene mecanismos adicionales de adquisición de variación génica (reordenamiento y recombinación). La OMS considera al virus de la influenza como el patógeno responsable de la próxima pandemia, aunque se desconoce que grave será y cuándo ocurrirá (PAHO, 2019; Simpson, 2020).

2. ANTECEDENTES

2.1. Características del virus

El virus de la influenza pertenece a la familia Orthomyxoviridae, los cuales tiene un genoma de ARN unicatenario en sentido negativo (de acuerdo a la clasificación de Baltimore). Los *influenzavirus A* están divididos en subtipos de acuerdo al tipo de proteína hemaglutinina (HA) o neuraminidasa (NA) que presente en su superficie; en la actualidad hay 17 diferentes hemaglutininas y 9 neuraminidasas (Condit, 2013; Richt y Webby 2013).

La partícula viral generalmente esférica tiene una envoltura lipídica derivada de la célula huésped y 9 o 10 proteínas estructurales (Fig.1 y Tabla 1). Las proteínas de la superficie son la hemaglutinina, la neuraminidasa y la proteína M2, las cuales son esenciales para la absorción y disipación del virus. La proteína M1 está por debajo de la membrana lipídica, dando rigidez. En el interior del virión se encuentran los ARN virales asociado a la nucleoproteína (NP) formando los segmentos, también se encuentran asociadas las proteínas que conformaran la polimerasa (PB1, PB2, PA). En menor cantidad se encuentra la proteína de exporte nuclear (NEP) y la proteína no estructural 2 (NS2) (Ricaniello, 2009; Condit, 2013; Richt y Webby 2013;).

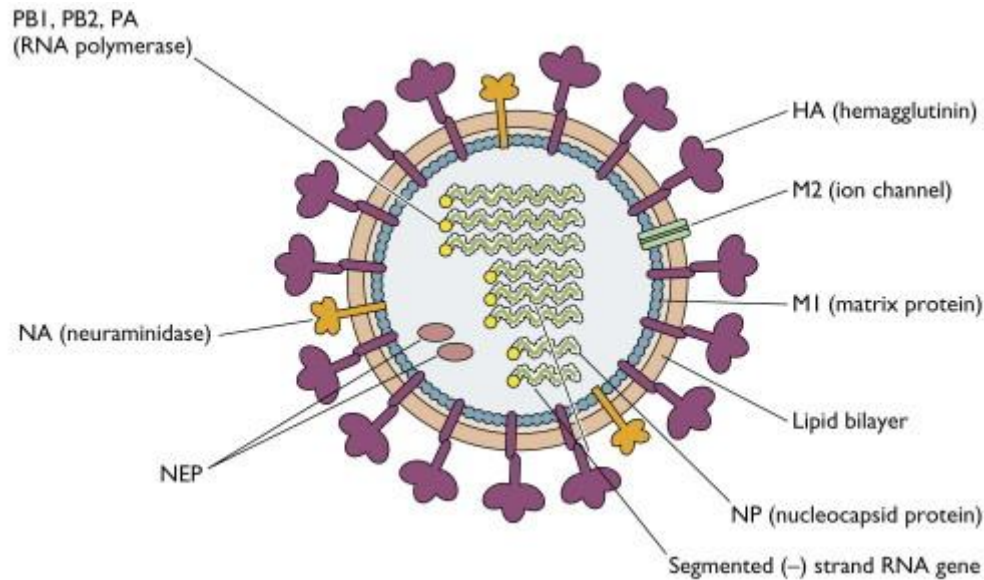


Figura 1. Estructura del virus de la influenza A. Su genoma de ARN (-) está segmentado, y es monocatenario, sostenido por la nucleoproteína (NP), mientras que la ARN polimerasa dependiente de ARN está constituida por las proteínas PB1, PB2 y PA. En la superficie destacan la hemagglutina (HA), neuraminidasa (NA), la proteína del canal iónico (M2) y la proteína estructural de la cápside denominada de matriz 1 (M1). También contienen otras proteínas no estructurales 1 (NS1), proteína no estructural 2 (NS2) y la proteína de exportación nuclear (NEP) (Richt y Webby 2013; Racaniello, 2009).

Tabla 1. Genoma y proteínas del virus de la influenza A

Segmento	Nucleótidos	Proteína	A.A.	Función
1	2,341	PB2	759	Subunidad de unión al Cap de la RdRp (ARN polimerasa dependiente de ARN)
2	2,341	PB1	757	Localización central del dominio polimerasa de la RdRp. Elongación.
		PB1-F2	87-91	Actividad proapoptótica. Antagonista de IFN.
		PB1	1-718	
		N40		Función desconocida
3	2,233	PA	716	Subunidad endonucleasa de la RdRp. Proteasa
4	1,778	HA	566	Glicoproteína de superficie: unión al receptor y fusión de membrana
5	1,565	NP	498	Nucleoproteína: encapsulación genómica y de ARN antígenómica
6	1,413	NA	454	Glicoproteína de superficie: destruye receptor de la neuraminidasa
7	1,027	M1	252	Proteína de matriz, ensamble y excreción de la partícula viral.
		M2	97	Canal iónico
8	890	NS1	230	Multifunctional proteína. Antagonista de IFN.
		NEP/NS2	121	Regulador de la síntesis del RNA

(Richt y Webby 2013; Condit, 2013)

2.2. Evolución del virus

El éxito en la proliferación del virus de la influenza está relacionado con los diferentes mecanismos de generación de variabilidad genética, la tasa de evolución del virus y su amplio repertorio de hospederos. Los mecanismos de ganancia de variabilidad genética de los virus de influenza son: los errores de la ARN polimerasa, el reordenamiento y la recombinación de diferentes segmentos (Richt y Webby 2013).

La ARN polimerasa de influenza carece de la actividad de corrección de errores por lo que al replicar el genoma se producen mutaciones que se van acumulando y cambian las secuencias de aminoácidos. La alta tasa de mutación genera variantes rápidamente. Se ha determinado que el virus de la influenza A tiene una tasa evolutiva media para todo el genoma de 2.3×10^{-5} sustituciones por célula infectada, mientras que para los virus de doble cadena de ADN esta es menor, por ejemplo el herpes virus simple tipo 1 tiene 5.9×10^{-8} sustituciones por célula infectada (Sanjuan et al., 2010; Richt y Webby, 2013).

Cuando una misma célula es coinfectada por dos virus existe la posibilidad de que ocurra recombinación génica y reordenamiento. La recombinación ocurre cuando dos segmentos de diferentes linajes encuentran regiones homólogas y las cadenas de cada segmento se intercambian. Adicionalmente, puede ocurrir reordenamiento génico debido a que los segmentos pueden ser empaquetados de manera indistinta dentro de la nueva cápside (Richt y Webby, 2013). Por ejemplo, el virus de la influenza A (H1N1) pandémico 2009 fue el resultado de múltiples eventos de reordenamiento de segmentos de linajes porcinos norteamericanos y eurasiáticos, que causó un cambio antigénico suficiente para no ser reconocido por el sistema inmune y provocar el brote epidémico (Garten et al., 2009).

Todos estos mecanismos le permiten al virus de la influenza evolucionar rápidamente para evadir al sistema inmunológico o bien generar nuevas cepas resistentes a tratamientos antivirales.

2.3. Tratamientos

Actualmente existen medicamentos para el tratamiento de la influenza (derivados de los adamantanos, inhibidores de la neuraminidasa e inhibidores de la polimerasa), sin embargo, su uso se ha asociado a efectos colaterales (Fujita, 2021; WHO, 2010).

Los derivados de los adamantanos (amantadina y rimantadina) son moléculas que bloquean a la proteína M2 viral, evitando la acidificación del endosoma, por lo tanto, la hemaglutinina no cambia de conformación y no se realiza la fusión de la membrana viral con el endosoma (Jones et al., 2006). Particularmente estas moléculas solo tienen efectos en influenza A, debido a que la estructura de la proteína M2 en influenza B, C y D son diferentes. Adicionalmente, existen muchas cepas virales que son resistentes a este medicamento, esta resistencia comúnmente está asociadas a mutaciones de un solo cambio de aminoácido, en las posiciones: 26, 27, 30, 31 o 34 de la proteína M2. Las cepas circulantes de influenza han demostrado ser resistentes a los derivados de la adamantina, por lo tanto, la OMS no recomienda su uso, ni como tratamiento ni como profilaxis (Fujita, 2021). Un ejemplo de este fenómeno es que durante la temporada de influenza 2019, más del 99% de las cepas de H3N2 y H1N1 eran resistentes a la adamantina (Toots y Plemper, 2020). Adicionalmente, los adamantinos han mostrado como efectos secundarios trastornos al sistema nervioso central, náuseas, vómitos, deterioro en la concentración y convulsiones, por lo tanto se ha discontinuado su uso en humanos en varios países (Richt y Webby 2013).

Los inhibidores de la neuraminidasa (oseltamivir, peramivir, zanamivir y laninamivir) son derivados del ácido neuramínico deshidratado (Neu5Ac2en), el cual simula la estequiometría del estado de transición de la neuraminidasa del virus durante la reacción enzimática (Li et al., 1998). Estas moléculas se unen al sitio activo de la neuraminidasa, provocando que los viriones no puedan liberarse de la membrana celular progenitora. Actualmente se sabe que el oseltamivir tiene efectos secundarios como náuseas, vómitos, efectos psiquiátricos y renales, mientras que el Zanamivir causa broncoespasmos (Richt y Webby, 2013).

La resistencia a los inhibidores de la NA está asociada a sustituciones puntuales como la H257Y en cepas A H1N1, así como E119V, R292K o N294S en A H3N2. Las sustituciones en la NA: Q136K (en la cepa A H1N1) e I223R (en la cepa A H3N2) generan resistencia al zanamivir (Toots y Plemper, 2020). La cepa del virus de influenza A H1N1 contienen las mutaciones E119D y H257Y en la neuraminidasa, las cuales le confiere resistencia al uso del Zanamivir, Oseltamivir, Peramivir y Laninamivir (L'Huillier et al., 2015). La aparición de estas variantes resistentes está asociada al aumento de la presión selectiva generada por el uso desmedido de los antivirales y probablemente en el futuro, las cepas resistentes puedan remplazar a los virus silvestres (Fujita, 2021).

El último grupo de medicamentos son los inhibidores de la polimerasa viral. La ARN polimerasa dependiente de RNA es altamente conservada en influenza A, B, C y D, además está compuesta por tres subunidades: Polimerasa básica 1 (PB1), polimerasa básica 2 (PB2) y polimerasa ácida (PA) en los virus de la influenza A y B, mientras que los influenza virus C y D portan la polimerasa 3 (P3). El diseño de los inhibidores es dirigido hacia un sitio específico: favipiravir se une a PB1, pimodivir a PB2 y baloxavir marboxil a PA. Cada antiviral tiene un mecanismo de acción diferente. El favipiravir es reconocido como un análogo de la purina e incorporado a la cadena naciente de ARN, causando un paro en la polimerización (Furuta et al., 2005; Sleeman et al., 2010; Takashita, 2020). El pimodivir es un ácido carboxílico ciclohexánico que ocupa el dominio de unión al cap de la PB2 e inhibe la unión del ARN. Baloxavir marboxil es un farmacóforo que puede hidrolizarse por las esterasas corporales y convertirlos en ácido baloxavir, el cual tiene como función unirse al dominio endonucleasa de la PA (Takashita, 2020) y evitar el decapitamiento de los RNA mensajeros del hospedero. Este medicamento tiene actividad antiviral contra todos los grupos de influenza. El uso clínico de este medicamento se aprobó en el 2018 (Toots y Plemper, 2020). Los tres fármacos tienen la característica que solo son administrados cuando los pacientes tienen alto riesgo de sufrir complicaciones, porque dichos medicamentos se encuentran en la Fase III de experimentación y aún se están estudiando sus efectos colaterales. Hasta el momento, en estudios realizados en líneas celulares, no se ha demostrado

la generación de variantes resistentes que comprometan la efectividad de estos fármacos (Takashita, 2020).

El medicamento más reciente es un análogo de ribonucleósido N^4 – hidroxicitidina (NHC) denominado MK-4482/EIDD-2801. Este es un profármaco que es metabolizado en forma de un trifosfato bioactivo en el epitelio a tratar y se incorpora como una citidina en el ARN viral por las polimerasa del virus, induciendo una gran cantidad de errores catastróficos en la replicación viral. Los análogos de los ribonucleósidos tienen como desventaja el riesgo potencial de la incorporación en el ARN del hospedero por las polimerasas nucleares y mitocondriales. Para este tipo de medicamento se tiene que realizar más análisis sobre los efectos adversos (Toots y Plemper, 2020;Cox et al., 2021).

El estado del arte del uso de antivirales demuestra la necesidad del desarrollo de nuevas estrategias para el control de la influenza, como el uso de péptidos capaces de bloquear la internalización del virus a la célula y disminuir la transmisión.

2.3.1. El uso de péptidos como estrategia antiviral.

Los eucariotas han desarrollado evolutivamente péptidos biológicamente activos como mecanismo de protección química básica para contener las infecciones causadas por bacterias, protozoarios, hongos y virus. Dichos péptidos han sido utilizados en el área clínica contra las bacterias. Los mecanismos de acción de los péptidos dependen de su estructura y pueden ser mejorados a través de las modificaciones evitando comprometer su eficiencia terapéutica. Básicamente los péptidos son diseñados para que mimeticen o interactúen en los sitios activos de las proteínas superficiales de los patógenos (Skalickova et al., 2015).

Las propiedades intrínsecas de los péptidos (carga neta, hidrofobicidad, helicidad y estructura) son las características más importantes en las aplicaciones terapéuticas. Particularmente, como terapia antiviral existen tres mecanismos terapéuticos: a) péptidos inhibidores de la unión e internalización del virus a la

célula, b) péptidos que irrumpen la membrana viral y c) péptidos inhibidores de la replicación viral (Skalickova et al., 2015). Recientemente se ha propuesto el uso de péptidos antivirales capaces de bloquear la entrada del virus a las células de mucosas respiratorias, para el caso de influenza destaca el péptido Entry Blocker (EB).

2.3.1.1. El péptido Entry Blocker como estrategia de inhibición del anclaje viral a la célula

El péptido Entry Blocker (EB) de 20 aminoácidos es derivado de la secuencia señal del factor 4 de crecimiento del fibroblasto. Este péptido en sus inicios mostró un efecto virucida contra el virus del herpes simple y antiviral en el virus vaccinia. Cuando se probó la capacidad inhibitoria del péptido EB contra diferentes cepas del virus de la influenza A, se observó un efecto antiviral de amplio espectro (Akkarawongsa et al., 2006; Jones et al., 2006; Altmann et al., 2012). El mecanismo de acción putativo del péptido EB es unirse a la hemaglutinina viral, por tanto, impedir la asociación con el ácido siálico de los receptores celulares, evitando la internalización del virus. Otra particularidad del péptido es su nulo efecto citotóxico en las líneas celulares y en modelos *in vivo* (Jones et al., 2006; Altmann et al., 2012). Este péptido tiene potencial para ser utilizado como una alternativa de terapia antiviral.

2.4. Vacunas

Una de las estrategias profilácticas para disminuir la transmisión y el contagio de enfermedades infecciosas es la vacunación. El primer paso en el desarrollo de la vacuna contra influenza fue en 1933 donde se realizó el aislamiento y propagación del virus en hurón. En 1936 se desarrolló una vacuna monovalente de Influenza A de virus vivos atenuados. Para 1940, se descubrió y aisló el virus de la influenza B y a los dos años fue posible producir 10,000 dosis de una vacuna bivalente de virus inactivos con formalina de las cepas A/PR8 y B/Lee (Hannoun, 2013). Desde esa época la plataforma de replicación de los virus fueron huevos embrionados. A partir

de ahí se comenzó el desarrollo de nuevas estrategias para mejorar la protección, eficacia y seguridad de las vacunas.

2.4.1. Vacunas actuales

Anualmente las instituciones internacionales como la Food and Drug Administration (FDA), la Organización Mundial de la Salud (OMS), y el CDC son los encargados de la supervisión de la influenza, además de la recopilación de los datos epidemiológicos y de laboratorio en todo el mundo. Dichas acciones se realizan para identificar a las nuevas cepas que tenga el potencial de causar enfermedades en el futuro. La FDA selecciona las cepas relevantes que deben incluirse en las vacunas a aplicar en la población para la próxima temporada de influenza (FDA, 2020).

Actualmente ha licenciado varias vacunas anti-influenza (Tabla 2) dentro de las cuales destacan vacunas de virus inactivos (IIVs), vacunas de virus vivos atenuados (LAIVs), vacunas trivalentes inactivas (TIVs), vacunas cuadrivalentes inactivas (QIVs) y una vacuna de HA recombinante (FDA, 2020).

Gran parte de las vacunas licenciadas por la FDA mostradas en la Tabla 2, utilizan como plataforma para la producción de partículas virales los huevos embrionados de pollo. A pesar de ser el método primordial para el aislamiento y cultivo viral, dicha tecnología presenta algunas desventajas, como son: requerir de instalaciones especializadas, el escalamiento en la producción es complicado, el proceso de producción es tardado y las cepas reproducidas no siempre tienen inmunidad óptima (Treanor et al., 2007).

El talón de Aquiles de la producción de las vacunas en embriones de huevo es su incapacidad para la generación de vacunas rápidamente. El problema reside en la metodología para la inoculación y cosecha viral. Adicionalmente se ha observado que algunos virus adaptados a huevos no son idénticos a los de la naturaleza y puede producir una inmunoprotección inadecuada (Pawelec y McElhaney, 2020)

Tabla 2. Vacunas profilácticas licenciadas por la FDA

Tecnología	Plataforma	Nombre del producto	Marca	Farmacéutica
IIVs	Embriones de pollo	Vacuna monovalente de Influenza A (H1N1)2009	S/N	CSL limited
IIVs	Embriones de pollo	Vacuna monovalente de Influenza A (H1N1)2009	S/N	MedImmune LLC
IIVs	Embriones de pollo	Vacuna monovalente de Influenza A (H1N1)2009	S/N	ID Biomedical Corp of Quebec
IIVs	Embriones de pollo	Vacuna monovalente de Influenza A (H1N1) 2009	S/N	Novartis Vaccines and Diagnostics limited
IIVs	Embriones de pollo	Vacuna monovalente de Influenza A (H1N1) 2009	S/N	Sanofi Pasteur, Inc.
IIVs	Embriones de pollo	Vacuna de Virus Influenza H5N1 (Nacional)	S/N	Sanofi Pasteur, Inc.
IIVs	Embriones de pollo	Vacuna monovalente contra la Influenza H5N1, adyuvante	AUDENZ	Seqirus, Inc.
IIVs	Embriones de pollo	Vacuna monovalente de influenza A (H5N1) adyuvante	S/N	ID Biomedical Corp of Quebec
QIVs	Embriones de pollo	Vacuna cuadrivalente (A y B), adyuvante	FLUAD QUADRIVALENT	Seqirus, Inc.
TIVs	Embriones de pollo	Vacuna trivalente contra la influenza (A y B), adyuvante	FLUAD	Seqirus, Inc.
QIVs	Embriones de pollo	Vacuna cuadrivalente (A y B), adyuvante	A Afluria Quadrivalent, Southern Hemisphere	Seqirus Pty Ltd
QIVs	Embriones de pollo	Vacuna cuadrivalente (A y B)	Flucelvax Quadrivalent	Seqirus, Inc
TIVs	Embriones de pollo	Trivalente (A y B)	Afluria. Hemisferio Sur	Seqirus Pty. Ltd
QIVs	Embriones de pollo	Vacuna cuadrivalente (A y B)	Afluria.	Seqirus Pty. Ltd
TIVs	Embriones de pollo	Trivalente (A y B)	FluLaval	ID Biomedical Corp of Quebec
LAIVs	Embriones de pollo	Vacuna contra la influenza, viva, intranasal (trivalente A y B)	FluMist	MedImmune, LLC
TIVs	Embriones de pollo	Trivalente (A y B)	Fluarix	GlaxoSmithKline Biologicals
TIVs	Embriones de pollo	Trivalente (A y B)	Fluvirin	Seqirus Vaccines Limited
TIVs	Embriones de pollo	Influenza Vaccine, Surface Antigen, Trivalente A y B	Agriflu	Seqirus Inc
QIVs	Embriones de pollo	Vacuna cuadrivalente (A y B)	Fluzone, Fluzone de dosis alta y	Sanofi Pasteur, Inc

QIVs	Embriones de pollo	Vacuna cuadrivalente (A y B)	Fluzone intradérmico	Sanofi Pasteur, Inc
TIVs	Células MDCK	Trivalente (A y B)	Flucelvax	Seqirus Inc
Vacuna de HA recombinante	Células de insecto	Vacuna de HA recombinante trivalente (A y B)	Flublok	Protein Sciences Corporation
Vacuna de HA recombinante	Células de insecto	Vacuna de HA recombinante tetravalente (A y B)	Flublok	Protein Sciences Corporation
LAIVs	Embriones de pollo	Vacuna intranasal viva tetravalente (A y B)	FluMist	MedImmune, LLC
QIVs	Embriones de pollo	Vacuna cuadrivalente (A y B)	Fluarix Quadrivalent	GlaxoSmithKline Biologicals
QIVs	Embriones de pollo	Vacuna cuadrivalente (A y B)	Flulaval Quadrivalent	ID Biomedical Corporation

IIVs (Inactivated influenza vaccine; vacuna de influenza virus inactivos); LAIV (Live attenuated influenza vaccine; vacuna de influenza virus vivos atenuados); TIV (Trivalent inactivated vaccine; vacuna trivalente inactivada); QIVs (Quadrivalent inactivated vaccine); HA (Hemaglutinina); S/N (sin nombre) (Tomado de la FDA, 2021).

2.4.2. Nuevas plataformas de producción de vacunas

La plataforma para la producción de vacunas por excelencia ha sido los huevos embrionados de pollo, sin embargo, se ha comenzado a explorar nuevas plataformas para la producción de vacunas más rápidas y eficaces. La primera plataforma en explorar fue el cultivo en células de mamífero y seguida por las células de insecto.

Adicionalmente se han explorado plataformas como bacterias, hongos y plantas. Cada una de ellas con diferencias en el de diseño vacunal, pero en esencia buscan promover una mejor respuesta inmune duradera y un proceso de producción más rápido y escalable en comparación con la producción en huevo.

2.4.2.1. Cultivo celular

Una de las plataformas más atractivas es el cultivo del virus de la influenza, debido que se puede cultivar un gran número de células, infectarlas con una cantidad muy baja de virus y cosechar una gran cantidad de nuevas partículas virales. Esta tecnología es muy amable para la propagación de influencias que afectan al humano, porque los virus producidos en cultivo celular son antigénicamente más similares a los circulantes en la población humana (Rockman et al., 2020).

A la fecha están disponibles comercialmente dos vacunas producidas en cultivo celular Seqirus Limited (Holly Springs, NC, USA) fabricada como Flucelvax® Quadrivalent (Flucelvax®TETRA), la cual es una vacuna de subunidades producidas en células MDCK 33016PF. Dicha vacuna ha mostrado un inmunogenicidad de similar a su homólogo producido en embriones de pollo, pero demostrado una buena efectividad profiláctica, tolerancia y presentan efectos secundarios aceptables. Uno de sus principales aportes es que tiene eficacia en adultos mayores a 60 años. (Pawelec y McElhaney, 2020; Rockman et al., 2020). La segunda vacuna es SK Chemicals (Gyeonggi-do, Korea) producida por SKYCellflu trivalente y cuadrivalente, dicha vacuna es de subunidades cultivadas en las células MDCK-Sky3851, su aplicación comienza desde los seis meses de edad hasta adultos mayores (Rockman et al., 2020).

A pesar del gran desempeño que han mostrado las vacunas producidas por medio del cultivo celular, este sistema tiene la desventaja de que para producir las vacunas es necesario contar con personal calificado para el trabajo del virus activo además de contar con laboratorios de bioseguridad BSL3 o BSL2 plus. Otro inconveniente es el costo de producción ya que el material, insumos y reactivos necesarios para el cultivo celular son costosos.

Un nuevo campo en la producción de vacunas de subunidades se ha desarrollado recientemente, se utilizan células de insecto y ya se encuentra disponible para el uso en humanos. Flublok™, producido originalmente por Protein Sciences Corporation, Meriden, CT, E.U.A. (Comprado recientemente por Sanofi) fue autorizado por la FDA para su uso en personas mayores a 18 años. Flublok™ tiene como principio activo 45 µg de HA recombinante purificada, dicha proteína se expresa mediante el baculovirus *Autographa californica nuclear polyhedrosis*, el cual infecta a una línea celular no transformada y no tumorigénica (células de insectos exprés SF+) derivado del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda*. En general, los ensayos clínicos de esta vacuna han demostrado que es segura y eficaz (Treanor et al., 2007; Rockman et al., 2020).

2.4.2.2. Bacterias como biofábricas de vacunas universales.

Otro prototipo de vacunas de recién interés es el desarrollo de vacunas universales contra influenza en bacterias. El objetivo de este tipo de vacunas es la obtención de anticuerpos contra el dominio del tallo de la HA, el cual tiene la característica de ser conservado entre los subtipos de influencias. Adicionalmente los anticuerpos contra regiones conservadas han demostrado una reacción cruzada contra otras cepas (Rockman et al., 2020). Las regiones conservadas se pueden encontrar también en las proteínas M1, NP, M2 y la polimerasa viral de influenza. Atsmon et al. (2012) diseñaron una vacuna (Multimeric-001) la cual contiene epítomos lineales conservados de las proteínas HA, NP y M1 de las cepas de los subtipos A y B, tanto estacional como pandémica. Los epítomos candidatos se combinaron en un solo poliepítomo recombinante. Dicha proteína se expresó en *Escherichia coli* y se purificó por columnas de intercambio iónico y columnas hidrofóbicas. En los ensayos preclínicos mostró inmunogenicidad e inmunoprotección contra diversas cepas de influenza. El ensayo de fase I de la vacuna multimeric-001 mostró producción de anticuerpos IgG, así como la activación de la inmunidad celular, sin producir efectos adversos.

La prueba clínica de la vacuna multimeric-001 en la población anciana mostró ser un candidato atractivo para la inmunización de la población adulta mayor de 65 años. La evaluación de la acción independiente se basa en la inducción de la inmunidad celular y mostró capacidad de inducir la respuesta protectora contra HA (Atsmont et al., 2014).

En este prototipo de vacuna se ha observado que lo más importante es la elección de los epítomos a inmunizar y que se presenten de manera lineal, mientras que la plataforma de expresión de la proteína recombinante queda en un segundo plano; sin embargo, es preferente explorar nuevas plataformas de producción que mejoren la actividad inmunogénica.

2.4.2.3. Planta

El uso de los sistemas vegetales para la producción de farmacéuticos biológicos comenzó con la expresión de una hormona de crecimiento humana quimérica expresada en tabaco y girasol en 1986. A partir de ese momento se comenzó a ver a las plantas como una interesante plataforma de producción de proteínas recombinantes. Las principales razones son el bajo costo de infraestructura y la posibilidad de un escalamiento de la cantidad de biomasa. El primer tratamiento derivado de plantas genéticamente modificadas aprobado por la FDA fue producido por Protalix en 2012. Para la producción de este biofármaco se utiliza un sistema de suspensión de células de zanahoria transgénicas para producir taliglucerasa alfa, para el tratamiento de la enfermedad de Gauche (LeBlanc et al., 2021).

Actualmente se exploran diferentes especies de sistemas vegetales como biofábricas, pero el sistema por excelencia es *Nicotiana benthamiana* para diferentes empresas como Medicago (<https://www.medicago.com>), Kentucky BioProcessing (<https://kentuckybioprocessing.com>), PlantForm (<https://www.plantformcorp.com>), Icon Genetics (<https://www.icongenetics.com/>), iBio (<https://www.ibioinc.com>), CapeBio ([https:// capebioscience .com](https://capebioscience.com)), Bioapp (<http://bioapp.co.kr>) y Leaf Expression Systems (<https://www.leafexpressionsystems.com>) (LeBlanc et al., 2021).

Dentro del desarrollo de vacunas en plantas, la empresa que tiene el desarrollo biotecnológico más avanzado es Medicago (Quebec City, QC, Canadá). Dicha empresa ha desarrollado una vacuna tetravalente de partículas similares a virus (VLP) en *N. benthamiana* utilizando la expresión transitoria. Las VLP tienen la característica de tener en la superficie trómeros de HA. En este estudio en la fase III en adultos sanos de 18 a 49 años de edad (n=1,200), se aplicó una inyección intramuscular de 0.5 mL de VLP cuadrivalente (30 µg de HA por cepa) y se mostró una tasa de seroprotección de ≥70%. En cuanto a las reacciones adversas fueron generalmente leves y transitorias, equivalentes a los reportados por la inmunización de las vacunas antigripales inactivadas (Ward et al., 2021).

En un estudio previo realizado en adultos (18-64 años) se demostró que la vacuna era eficaz y cumplía con los criterios de valoración primaria en comparación con las vacunas inactivadas de influenza. Sin embargo, debido a que sus criterios de eficacia son relativamente bajos ($\geq 70\%$), Medicago pretende mejorar este porcentaje probando el desarrollo de una vacuna contra influenza, pero adicionando un adyuvante (Ward et al., 2020; Rockman et al., 2020).

2.4.2.4. Otros sistemas de expresión

Recientemente las microalgas han tomado gran importancia en su uso biotecnológico debido a las facilidades para su cultivo y mantenimiento de bajo costo. Además, la gran capacidad que tienen estos organismos para incrementar su biomasa en poco tiempo, ha llevado a varios científicos a explorarlas como plataformas de producción de biofarmacéuticos.

La gran ventaja de las microalgas es la de ser inocua para el consumo humano y en ciertas ocasiones las algas sirven como fuente de nutrientes dietéticos, por lo tanto, cuando se producen en ellas biofármacos, solo se requiere pocos pasos de purificación. Adicionalmente las microalgas carecen de compuestos endógenos nocivos en contraste con las bacterias, hongos o células de mamíferos, las cuales sufren el riesgo de contaminación por virus u otros patógenos (Rosales-Mendoza, et al., 2020).

En la actualidad la especie de microalga más estudiada en su biología molecular es *Chlamydomonas reinhardtii*, de la cual hablaremos en la siguiente sección.

2.5. *Chlamydomonas reinhardtii*

Esta microalga es un organismo unicelular ovalado (10 micras de longitud), biflagelar y fotosintético, además puede crecer autotrófica, mixotrófica o heterotróficamente (Rochaix, 1995). Actualmente se ha utilizado como una plataforma para la producción de proteínas terapéuticas gracias a las siguientes

ventajas: producción rápida de proteínas recombinantes con cantidades que van de miligramos a gramos, el cultivo es relativamente económico, de confinamiento total, fácilmente escalable y libre de contaminantes exógenos, la transformación genética nuclear o de cloroplasto es relativamente rápida y estable, la expresión de proteína vía cloroplasto muestra un plegamiento correcto y un ensamble complejo similar al que ocurre en los mamíferos; además es reconocida por la FDA como categoría GRAS (Generally Recognized as Safe), por lo consiguiente la microalga puede ser consumida vía oral y fungir como vía de entrega de la proteína terapéutica (Mayfield et al., 2003; Mayfield et al., 2007).

Alrededor del mundo se han desarrollado diferentes biofármacos en *C. reinhardtii* siendo de principal interés el desarrollo de vacunas. Dentro de ellas se encuentra una vacuna contra la alergia alimentaria producida por las nueces, dicha vacuna expresada en el cloroplasto de la microalga mostró proteger a los ratones contra anafilaxia (Gregory et al., 2016; Rosales-Mendoza et al., 2020). Adicionalmente se ha producido una vacuna contra la malaria la cual reduce el porcentaje de parasitemia en ratones, después de haber recibido una dosis oral de la vacuna producida en el cloroplasto de la microalga (Hempel y Maier, 2012; Rosales-Mendoza et al., 2020). Otro ejemplo es un prototipo de vacuna diseñada contra el papilomavirus humano 17, dicha vacuna demostró protección antitumoral en ratones inmunizado por la vía subcutánea (Demurtas et al., 2013; Rosales-Mendoza et al., 2020).

Otro ejemplo de producción de biofarmacéuticos en microalgas es el desarrollo de una línea transplastómica capaz de expresar y bioacumular péptidos antihipertensivos en el cloroplasto alcanzado un rendimiento de 0.292 mg de proteína recombinante por mg de biomasa liofilizada. Este estudio demostró que la administración intragástrica de la microalga que contenía los péptidos antihipertensivos, redujo la presión sistólica en ratas hipertensas (Ochoa-Méndez et al., 2016).

La presente investigación tuvo como objetivo desarrollar diferentes estrategias para contrarrestar la transmisión y la severidad de la infección causada por el virus de la influenza. Basándonos en las ventajas de *C. reinhardtii* para la producción de biofarmacéuticos, en este trabajo realizamos las pruebas biológicas de un péptido antiviral (Entry Blocker) expresado en la microalga. Adicionalmente establecimos las condiciones para la expresión y purificación de una vacuna universal para las cepas de influenza pandémica tanto en la microalga como en un sistema bacteriano.

3. OBJETIVOS

Evaluar la efectividad biológica de un péptido antiviral (Péptido Entry Blocker) y una vacuna contra el virus de la influenza producidos en la microalga *C. Reinhardtii* y en *E. coli*, como estrategia para minimizar la transmisión y la patogenia de la infección.

- **Objetivos específicos**

- 1.- Demostrar que es posible transformar a *C. reinhardtii* con los vectores que contienen el gen del péptido antiviral (EB) y la proteína antigénica (PA).
- 2.- Evaluar si los transgenes logran insertarse en el genoma nuclear y en el del cloroplasto de la microalga.
- 3.- Analizar si el péptido antiviral es producido en de las microalgas transformadas.
- 4.- Evaluar el efecto citotóxico de los péptidos extraídos de las microalgas transformadas sobre la línea celular MDCK.
- 5.- Determinar si el péptido EB expresado en microalgas inhibe la hemaglutinación causada por el virus de la influenza A H1N1
- 6.- Evaluar si péptido EB expresado en microalgas inhibe la replicación del virus de la influenza en la línea celular MDCK.
- 7.- Evaluar si el núcleo y el cloroplasto de las microalgas transformadas contienen la proteína antigénica recombinante P.A vs influenza.
- 8.- Determinar si es posible producir la proteína antigénica P.A en la bacteria *E. coli* BL21 star para contar con un control.

- 10.- Analizar la respuesta inmune en ratones al administrarles la proteína antigénica P.A producida en *E. coli*.
- 11.- Determinar la capacidad neutralizante del virus de la influenza de los anticuerpos producidos en ratón por la inmunización con la proteína antigénica P.A.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Péptido EB

4.1.1. Condiciones de crecimiento de la microalga

Las cepa CC-137 mt(+) de *C. reinhardtii* fue utilizada para las transformaciones de los transgenes de interés. Los cultivos de las microalgas se desarrollaron en medio TAP (Tris-Acetato-Fosfato) líquido (con agitación constante a 120 rpm) o sólido (15 g de agar bacteriológico/L) a 23 °C con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad.

4.1.2. Diseño del péptido EB

Al péptido EB (RRKKAVALLPVLLALLAP) (Jones et al., 2006), se le adicionó: un péptido señal, sitio de corte de proteasa, etiqueta de histidina, secuencia KDEL (para la expresión nuclear y retención en retículo endoplásmico) y sitios de unión a ribosoma (para la expresión en cloroplasto) (Figs. 2 a y b). Los genes con codones optimizados para expresión nuclear en *C. reinhardtii* fueron clonados en el vector pChlamy_1, y los genes para el cloroplasto fueron clonados en vector p463 (Figs. 2 c y d). Las construcciones fueron corroboradas por PCR, por su patrón de digestión con enzimas de restricción y secuenciación.

La transformación nuclear se realizó vía *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, mientras que la transformación de cloroplasto fue realizada por biobalística. Los transformantes nucleares se mantuvieron en rondas de selección en medio TAP con 15 mg/L de higromicina, mientras que los transformantes de cloroplasto se mantuvieron en TAP con 100 mg/L de espectinomicina.

KpnI PS EB ETQ HIS KDEL ALTO *XbaI*

NcoI R B S EB ETQ HIS ALTO R B S *NcoI*

Simbología

PS	Péptido señal
ETQ	Sitio de corte de proteasa
HIS	Hexahistidina
ALTO	Doble codón de paro
KDEL	Sitio de retención a retículo endoplásmico
RBS	Sitio de unión a ribosoma

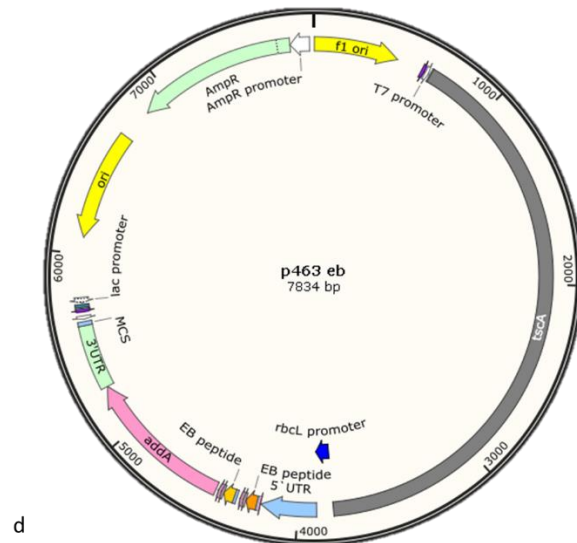
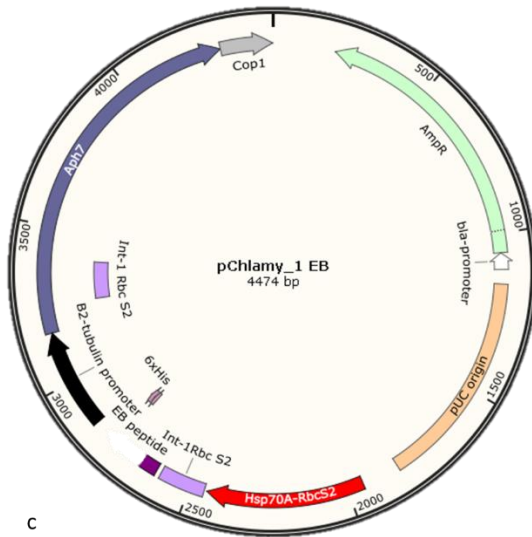


Figura 2. Diseño del péptido EB y esquema de las construcciones para la transformación de *C. reinhardtii*. Diseño de los péptidos para la expresión nuclear y en cloroplastos en *C. reinhardtii*; a) Péptido antiviral EB para la expresión nuclear, contiene los sitios de restricción *KpnI* y *XbaI* para clonarse en el vector pChlamy_1; b) Péptido antiviral EB para la expresión en cloroplasto, contiene los sitios *NcoI* para clonarse en el vector p463. Diagrama de las construcciones para expresión nuclear y en cloroplastos; c) El gen EB se encuentra clonado bajo el promotor Hsp70A-RbcS2 y el intrón 1Rbc S2 en el vector pChlamy_1; d) El gen EB esta clonado como policistrón junto con el gen *addA* en el vector p463.

4.1.3. Análisis por PCR de las microalgas transgénicas y transplastómicas

El ADN fue extraído a partir de 15 mL de cultivo (TAP líquido) de las colonias resistentes a los antibióticos y de una microalga sin transformar (WT) por el método Newman et al., (1990). Para la identificación por PCR del gen de EB nuclear, se utilizaron los oligonucleótidos F-5' TGCTGCTGTTCTGCTGAT3' y R-5' GTGGTGCTTGTCGTCGTC3'. Por otra parte, para la detección del gen EB en las líneas putativamente transplastómicas se utilizaron los oligonucleótidos F-5' GGAGGACCGAATGCGTAAA 3' y R-5' TCAATATCACTGTGTGGCTTC 3'. La homoplasia se verificó con los oligonucleótidos que hibridan en la región tscA 5'-TGCCCGATTAGCTGTGTAGCTTGG-3' y ch1N 5'-ACTCTTGTGCCATCGGGGCCT-3', estas regiones flanquean al sitio de inserción del transgén (Reyes-Barrera, 2016)

4.1.4. Extracción de proteína de las algas transgénicas y transplastómicas que producen el péptido EB.

Para el análisis de expresión del péptido, se crecieron a las microalgas transgénicas y transplastómicas en 1 L de medio líquido TAP, que se inoculó con un preinóculo de 100 mL de cultivo (DO700 = 0.3). Después de 7 días, la biomasa se colectó mediante centrifugación a 10,000 rpm a 4 °C y se liofilizó. A la biomasa se le retiró la clorofila con lavados secuenciales de acetona al 100%, acetona 50%: metanol 50% y metanol al 100%. La biomasa se suspendió en un tampón de extracción (agua Milli Q o Tris-HCl 100 mM, pH 8) que contenía un cóctel de inhibidores de proteasa al 0.1% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos). La biomasa se sonicó al 30% de amplitud (4 ciclos de 30 s cada), se centrifugó a 12,000 rpm

durante 10 min y se recogió el sobrenadante. La concentración de proteína se midió a 205 nm usando una nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) de acuerdo con Altmann y col. (2009). Los extractos se analizaron mediante Tricina 18% SDS-PAGE y urea 6 M, finalmente se tiñeron con nitrato de plata.

Para poder detectar al péptido EB y cuantificarlo fue necesario producir un anticuerpo policlonal, por lo tanto, se desarrolló un ensayo de inmunización en ratón.

4.1.5. Producción de anticuerpos para el péptido EB en ratones BALB/c

Se realizó un ensayo de inmunización para la producción de anticuerpos contra el péptido, para ello se utilizó un péptido EB sintético (RRKKAVALLPVLLALLAP) sintetizado por GenScript Inc. (Piscataway, NJ. Estados Unidos). Para el ensayo de inmunización se usaron ratonas BALB/c de 4 semanas de edad y se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad (12 x 12 h) en cajas de policarbonato con tapas, con camas para roedores (ecobed), alimento para muridos (Lab Bio) y agua estéril. Los animales se mantuvieron en una densidad de 6 animales por caja en un equipo de alojamiento de tipo ALLENTOWN. El protocolo fue aprobado por el comité de bioética para el cuidado y el uso de animales de investigación del IPICYT, con el folio No. 8.

Los grupos experimentales fueron (n=6): Grupo 1 H₂O + 5% glicerol; Grupo 2 H₂O + 5% glicerol más TiterMax Gold Adjuvant [Copolímero CRL-(8300, escualeno y monooleato de sorbitan)] y el Grupo 3 péptido EB sintético + TiterMax Gold Adjuvant. La primera inmunización fue subdérmica cercana a los ganglios

inguinales y la dosis de péptido EB fue de 25 µg. La segunda y tercera inmunización fue vía intraperitoneal con una dosis de 50 µg del péptido EB, a los 15 y 30 días de la primera inmunización. Se realizó una sangría de cosecha (400 µL por ratón) se realizó el día 45 posterior a la primera inmunización. El día 60 se sacrificaron los ratones con una solución de Ketamina (200 mg/Kg de peso) y Xilacina (10mg/ Kg de peso) inyectada vía intraperitoneal y se realizó la cosecha total de sangre de cada animal (800 µL)

4.1.6. Purificación de anticuerpos contra el péptido EB

El péptido EB sintético se acopló de manera covalentemente a las Dynabeads M270 Epoxy (Thermo Fisher Scientific). Para ello se acopló 20 µg de EB sintético a 2.5 µg de Dynabeads utilizando 500 µL de persulfato de amonio 3M en PBS pH=7.4, esta reacción se dejó incubando a 37 °C en rotación por 24 horas. Posteriormente las Dynabeads se lavaron con PBS para retirar el péptido no acoplado. Al final las Dynabeads cubiertas se resuspendieron en PBS a una concentración de 10 mg/mL y se almacenaron a 4 °C.

Los sueros de los ratones inmunizados con el péptido EB se descongelaron y se les adicionó 1/10 del volumen de TBS 10X y coctel inhibidor de proteasas. Inmediatamente se adicionó 50 µg de las Dynabeads acopladas con EB y se dejó uniendo a los anticuerpos por rotación a 4 °C durante 4 h. Posteriormente se separaron las perlas por magnetismo y se lavaron tres veces con TBS-0.05 % Tween. La elución de los anticuerpos se logró adicionando 0.1 M de Glicina-HCl

pH= 2.5, se capturó el sobrenadante y se neutralizó la reacción con buffer N (Tris-HCl pH=8 y 50% Glicerol) y se almacenó a 4 °C.

La avidéz y la afinidad de los anticuerpos producidos primeramente se determinó por Dot Blot, para ello se colocó 1 µg de péptido EB en membrana de PVDF, el bloqueó de la membrana se realizó con 2% de caseína hidrolizada en TBS-0.04% Tween, como anticuerpo primario se utilizó anti-EB purificado a diferentes diluciones (1:250, 1:500, 1:1,000 en TBS-0.04% Tween y 0.05% de Caseína) por dos horas a temperatura ambiente. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti-ratón unido a fosfatasa alcalina (1:1,000). El Dot Blot se reveló utilizando una solución de NBT/BCIP y se dejó exponiendo por 10 min. También se realizó un Western Blot para analizar la capacidad de detección del anticuerpo, para ello se realizó una electroforesis en un gel Tricina- SDS-PAGE al 16% en gradiente cargando 1, 5 y 10 µg de péptido purificado y posteriormente se realizó una electrotransferencia semiseca a PVDF; a continuación, se dejó secar la membrana por 15 min, adicionalmente la calidad de la transferencia se determinó por tinción de Ponceau.

La membrana se bloqueó con 2% de caseína hidrolizada en TBS-0.04% Tween, como anticuerpo primario se utilizó anti-EB purificado a (1:100 TBS-0.04% Tween y 0.05% de Caseína) y se incubó toda la noche, el anticuerpo secundario que se utilizó fue anti-ratón unido a fosfatasa alcalina (1:1,000)

4.1.7. Detección y cuantificación del péptido EB en los extractos solubles de las microalgas transformadas

La proteína soluble total (TSP) de microalgas transformadas y WT se analizaron mediante Western Blot. Se disolvieron veinte microgramos de TSP en Tricina 18% SDS-PAGE en condiciones reductoras y se transfirieron a fluoruro de polivinilideno (PVDF) en un Turbo Transfer System (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos). La membrana se bloqueó con solución salina tamponada con Tris y Tween-20 al 0.04% (TBS-T) que contenía caseína hidrolizada al 2%. Posteriormente, la membrana se incubó con un anticuerpo policlonal de ratón anti-péptido EB a una dilución 1: 250 en TBS-T durante 2 h. Finalmente, la membrana se incubó con un anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP; A5420 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) a 1:4,000 en TBS-T durante 2 h. La detección de anticuerpos específicos se realizó utilizando el kit de sustrato de transferencia Western PIERCE ECL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La concentración del péptido EB se determinó por una ELISA indirecta. Para la curva control, a la placa de 96 pozos se le agregó el antígeno (EB sintético, GenScript, Inc.) utilizando desde 1 ng hasta 500 ng de EB sintético, de las muestras problemas se le agregó el antígeno con 500 ng de los extractos solubles. Se lavaron los pozos con TBS más 0.4% Tween 20, el bloqueo de los pozos se realizó con caseína hidrolizada al 2% por una hora. Se incubó con anticuerpo anti-EB a una dilución 1:100 en TBS más 0.4% de Tween con 0.5% de caseína hidrolizada por 2 h. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti-ratón unido a fosfatasa

alcalina a una dilución 1:1,500. Posteriormente, la reacción colorimétrica con una solución 3 mM de p-nitrofenilfosfato se leyó a 405 nm en el lector de absorbancia de microplacas iMar™ (Bio-Rad). Se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey y se consideró $p < 0.001$ como una diferencia estadísticamente significativa). El análisis estadístico y los gráficos se realizaron en el software GraphPad Prism 6.

4.1.8. Ensayos de citotoxicidad de los extractos de algas que producen EB

Las células Madin Darby Canine Kidney (MDCK) se crecieron en medio MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino contenidos en frascos de 75 cc. Se realizó una curva estándar, sembrando de 0 a 160,000 células, las células se adhirieron por 4 h, posteriormente se le adicionó 10 μ L de MTT [Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol], el cual solo puede ser transformado a una coloración violeta si la célula está viva. Se dejó incubar por 2 h a 37 °C, posteriormente los cristales de formazán se disolvieron con 50 μ L DMSO y se leyó a 490 nm en un lector de microplaca. Para el ensayo de citotoxicidad se sembraron 10,000 células por pozo, posteriormente se adicionó 0.3, 3 y 30 μ g de proteína total de los extractos de microalga transformada con el péptido EB, sin transformar y EB sintético, como controles se utilizaron medio MEM y urea 4 M. Se incubó por 72 h y se adicionó MTT para hacer la lectura colorimétrica. Al no presentarse citotoxicidad hasta con 30 μ g, este experimento se repitió usando 25 y 50 μ g de proteína total. Los datos se analizaron para un análisis de varianza bidireccional y las comparaciones múltiples de Dunnett a $p < 0.001$ se consideraron como una

diferencia estadísticamente significativa. El análisis estadístico y los gráficos se realizaron en el software GraphPad Prism 6.

4.1.9. Propagación de los stocks virales del virus de la influenza A H1N1

Las cepas virales de Influenza pdm2009 A/H1N1 e Influenza A H1N1 Virginia/ATCC/2009, fueron propagadas en las líneas celulares MDCK confluentes en botellas de 25 cc. De los stocks originales se realizaron diluciones seriadas en base log₁₀ en medio de infección (MEM 1X, 0.5 µg de Tripsina TPCK y 0.3% de BSA). A la monocapa celular, primero se le retiró el medio de crecimiento (MEM 1X suplementado con 10% de suero fetal bovino) y se lavó con PBS 1X por dos ocasiones. Posteriormente se le adicionaron 400 µL de la dilución viral, se incubó por 1 h a 37 °C con agitación orbital cada 15 min para evitar que la monocapa se deshidratara. Posteriormente se le adicionó 4.6 mL de medio de infección. La infección se siguió por 48 o 72 h mediante observación del efecto citopático. Posteriormente se tomó el sobrenadante, se centrifugó por 5 min a 1,500 rpm, se tomó el sobrenadante y almacenó en crioviales en nitrógeno líquido. Este procedimiento se realizó varias veces consecutivas con el objetivo de adecuar el virus a la línea celular, así como incrementar la infectividad de los virus. Para verificar la producción de partículas virales se monitoreó el sobrenadante a través del ensayo de hemaglutinación (sección 4.1.10).

4.1.10. Ensayo de hemaglutinación

Eritrocitos humanos tipo O se purificaron de sangre fresca, para ello se colectó 1 mL de sangre y se le adicionó 9 mL de PBS, se homogenizó y centrifugó a 1,500

rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante, este procedimiento se repitió hasta eliminar todo el plasma. Después se preparó una solución de eritrocitos al 0.5% en PBS.

En una placa de 96 pozos de fondo redondo se diluyó el virus 1:2 de forma consecutiva con PBS en un volumen de 50 μ L, como control positivo de la hemaglutinación se utilizó la vacuna de Newcastle Disease Virus (NDV) y como control negativo se usó PBS. En seguida se adicionó 50 μ L de la solución de eritrocitos y se incubó por una hora a 37 °C. Las muestras negativas mostraban un botón de eritrocitos en el fondo del pozo mientras que las positivas hacían una red de hemaglutinación. Dependiendo de la dilución en la que muestre la última hemaglutinación se calcularon las Unidades Hemaglutinantes del Virus (UHA).

4.1.11. Determinación de las unidades formadoras de placa de los virus

Un total de 350,000 células MDCK se adhirieron a los 6 pozos de una placa de cultivo celular y se dejaron crecer por 48 h a 37 °C, cuando llegaron a confluencia se les retiró el medio de crecimiento y se lavaron dos veces con medio MEM.

Los virus se diluyeron en medio de infección en logaritmo base 10 de 10^{-1} hasta 10^{-10} . De cada dilución se colocaron 200 μ L sobre la monocapa de cada pozo y se incubó a 37 °C por una hora realizando una oscilación del cultivo para evitar que se seque la monocapa. Posteriormente se retiró el inóculo y se lavó dos veces la monocapa con medio MEM. Posteriormente se colocaron 3 mL de medio de inmovilización (MEM 1X, 0.6% de agarosa, 0.5 μ g de Tripsina TPCK y 0.3% de BSA). La formación de placas se monitoreó con microscopio diariamente hasta observar placas líticas, una vez que las placas líticas estaban bien diferenciadas se

les agregó 1 mL de Formaldehído al 10% y se dejó fijando a 4 °C toda la noche. Se retiró el medio de inmovilización y la monocapa fue teñida con cristal violeta. Las placas líticas se contaron y se determinaron las unidades formadoras de placa lítica totales.

4.1.12. Determinación de las TCID₅₀ (Dosis infectiva en cultivo celular 50)

En los pozos de una placa de 96 se sembraron 50,000 células MDCK con medio de crecimiento y se dejaron adherir por 24 h a 37 °C, posteriormente se les retiró el medio de crecimiento y se lavó la monocapa con medio MEM 1X.

Los virus se diluyeron 1:10,000 en medio de infección, y a partir de ahí diluyeron con un factor de dilución 1:2; 100 µL de las diluciones del virus se colocaron sobre la monocapa por cuádruplicado, como control negativo se utilizaron solo 100 µL del medio de infección también por cuádruplicado. Enseguida se incubó por 1 h a 37 °C, después se retiró el inóculo y se lavó la monocapa con medio MEM 1X, posteriormente se retiró el medio MEM y se adicionaron 100 µL de medio de infección. El efecto citopático se monitoreo cada 24 h. A las 72 h fueron identificados aquellos pozos que presentaban efecto citopático y los que presentaban la monocapa integra. Se tomó el sobrenadante para corroborar la presencia de partículas virales por el ensayo de hemaglutinación. Las células de la placa de 96 pozos se fijaron con Formaldehído al 10% y posteriormente se tiñeron con cristal violeta.

4.1.13. Determinación de la actividad inhibitoria de la fusión del péptido EB

El ensayo de inhibición de la hemaglutinación se realizó con las dos cepas de influenza A H1N1. El péptido sintético y el producido en la microalga se diluyeron en una relación 1:2 con PBS. Los péptidos se probaron desde 0.8 μ M hasta 0.0003 μ M, los cuales se mezclaron con 64 UHA hemaglutinantes de virus, se incubó por una hora a 37 °C. A esta mezcla se le adicionaron 50 μ L de eritrocitos al 0.5% y se incubó por una hora a 37 °C. Los pozos con hemaglutinación fueron contados como sin efectos de inhibición. Se determinó el IC₅₀ para el péptido producido en algas y el sintético. Cada concentración se probó por triplicado. El porcentaje de inhibición obtenido de tres ensayos independientes se analizó en el software GraphPad Prism 6. El IC₅₀ se determinó mediante una curva de dosis-respuesta (Kawaoka y Neumann, 2012 ; Spackman, 2014).

4.1.14. Determinación de la actividad inhibitoria de la replicación viral del péptido EB

El ensayo de inhibición de la replicación viral se realizó con la cepa de Influenza pdm A/H1N1. El péptido sintético, los extractos de alga que contienen a EB y los extractos de algas sin transformar se diluyeron en el medio de infección y se diluyeron en una relación 1:2. También se contemplaron 4 pozos para el control celular que solo lleva medio, así como pozos para el control viral. A cada pozo se le adicionó 100 TCID de virus de la Influenza A, se incubó por 1 hora a 37 °C. Previamente se preparó la monocapa celular a infectar, para ello 24 horas antes en una placa de cultivo celular de 96 pozos se adicionó 50,000 células MDCK y el día de la infección se le retiro el medio MEM + 10% de Suero Fetal Bovino y se lavó dos veces cada pozo con medio MEM solo. Se retiró todo el medio de la monocapa

celular. Posteriormente se adicionó la mezcla de péptidos más virus y se dejó incubar por 1 hora a 37 °C y posteriormente se retiró el inóculo de la monocapa y se lavó con medio solo para retirar efectivamente cualquier virus del inóculo. Al final se le adicionó 100 µL de medio de infección a cada pozo y se incubó a 37 °C. El efecto citopático en la monocapa celular producto de la replicación viral, se siguió hasta las 48 h, para cada dilución de los sueros, el control celular y el control viral. Para comprobar la presencia de nuevas partículas virales en el sobrenadante, se tomó el sobrenadante de cada pozo y se tituló por hemaglutinación.

Para tener una mejor visualización del efecto citopático, la monocapa se fijó con 30 µL de formaldehído al 10% y posteriormente se tiñó con cristal violeta. El resultado de dos ensayos independientes se analizó en el software GraphPad Prism 6. Se determinaron IC₅₀ para cada péptido para una curva de respuesta a la dosis (Kawaoka y Neumann, 2012; Spackman, 2014).

4.2. Transformación y expresión de la proteína antigénica en microalgas.

4.2.1. Diseño de la proteína antigénica

Se seleccionaron epítomos relevantes mediante análisis bioinformáticos de las proteínas Hemaglutinina (HA), Neuraminidasa (NA), Nucleoproteína (NP), Proteína de Matriz 1 (M1) y Proteína de Matriz 2 (M2) del virus de la influenza A (H1N1). Las secuencias de aminoácidos de las proteínas se tomaron del Influenza Research Database (<http://www.fludb.org/brc/home.spg?decorator=influenza>) y se alinearon en MEGA 6.06 (<http://www.megasoftware.net/>) para elegir los epítomos conservados. Los análisis de antigenicidad se realizaron en Antheprot 6.6.6 (<http://antheprot-pbil.ibcp.fr/>), los análisis de reconocimiento del MHC clase I se realizaron en SYFPEITHI (Rammensee et al., 1999) mientras que para el MHC clase II se utilizó Propret (Singh y Raghava, 2001). Quince epítomos fueron elegidos y enlazados por espaciadores de prolina y glicinas (GPGPG). A la proteína antigénica (P.A) se le adicionó un péptido señal, sitio de corte de Enteroquinasa (proteasa), etiqueta de histidina, secuencia KDEL que retiene la proteína en retículo endoplásmico (para la expresión nuclear) y sitios de unión a ribosoma (para la expresión en cloroplasto) (Figs. 3 a y b).

Los genes con codones optimizados para *C. reinhardtii* para el núcleo fueron clonados en el vector pChlamy_1 y los genes para el cloroplasto fueron clonados en vector p463 (Figs. 3 c y d).

a.- Proteína antigénica para la expresión nuclear



b.- Proteína antigénica para la expresión en cloroplasto

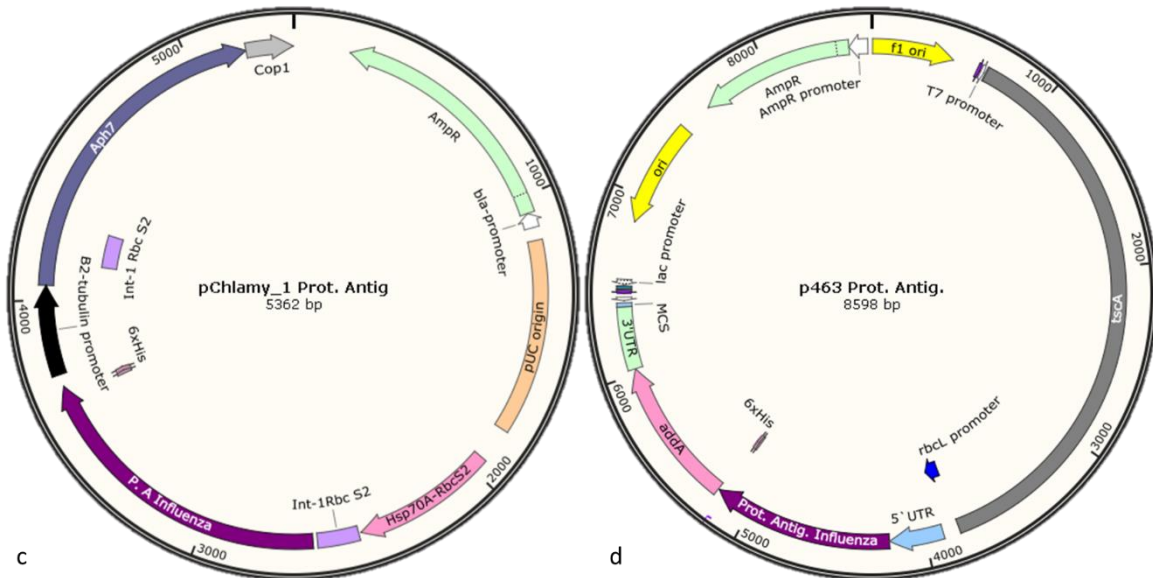
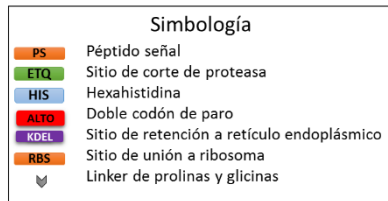


Figura 3. Diseño de la proteína antigénica contra influenza A H1N1. Diseño de los péptidos para la expresión nuclear y en cloroplastos en *Chlamydomonas reinhardtii*; a) Proteína antigénica P.A para la expresión nuclear contiene los sitios de restricción *KpnI* y *XbaI* para clonarse en el vector pChlamy_1; b) Proteína antigénica P.A para la expresión en cloroplasto contiene los sitios *NcoI* para clonarse en el vector p463. Diagrama de las construcciones para expresión nuclear y en cloroplastos; c) El gen de la proteína antigénica se encuentra clonado bajo el promotor Hsp70A-RbcS2 y el intrón 1Rbc S2 en el vector pChlamy_1; d) El gen de la proteína antigénica está clonado como bicistrón con el gen *addA* en el vector p463.

4.2.2. Análisis por PCR de las microalgas transgénicas y transplastómicas

El ADN fue extraído a partir de 15 mL de cultivo (TAP líquido) de las colonias resistentes a los antibióticos y de una microalga sin transformar (WT) por el método descrito por Newman et al., (1990). Para la identificación por PCR del gen de P.A nuclear, se utilizaron los oligonucleótidos F-5'CGAGCGCCGCAACAAG 3' y R-5'GCCGTACCAGCCGTCCACC 3', y para el gen P.A de cloroplasto se usaron: F-5'ATTATCCTAAAGGTCCTGGTC 3' y R-5' GATGACGCCAACTACCTCT 3', la homoplastia se verificó con los oligonucleótidos que hibridan en la región tscA 5'-TGCCCGATTAGCTGTGTAGCTTGG-3 y ch1N 5'-ACTCTTGTGCCATCGGGGCCT-3', estas regiones flanquean al sitio de inserción del transgén.

4.2.2.1. Extracción de proteínas y Western Blot

Las líneas transgénicas, transplastómicas y WT se crecieron en 100 mL de medio TAP el cual fue inoculado con un preinóculo de 10 mL ($OD_{700}=0.3$). Después de 5 días se colectó la biomasa por centrifugación a 10,000 rpm a 4 °C. La biomasa se resuspendió en Tris-HCl 50 mM pH=8, NaCl 40 mM, 0.1% Tween 20 y 0.1% de coctel de inhibidores de proteasas. Las microalgas fueron sonicadas a una amplitud de 30% por 5 s (tres ocasiones). Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 2 min; se tomó la fracción soluble. Para la obtención de la fracción insoluble, la pastilla se disolvió en tres volúmenes del buffer de urea (urea 8 M, $NaPO_4$ 20 mM pH=7.4 y

NaCl 500 mM), se incubó toda la noche a 4 °C y centrifugó a 12,000 rpm por 2 min y se tomó el sobrenadante. Los extractos se guardaron a -70 °C.

La cuantificación de proteínas se realizó con el método de Bradford utilizando una curva estándar de BSA, la absorbancia se leyó a 595 nm en el espectrómetro GloMax®-Multi+ Microplate Multimode Reader con Instinct® (Promega Corporation, Madison, WI, USA).

Cincuenta microgramos de extracto total de proteínas se mezclaron con buffer de Laemmli y se calentaron por 5 min a 95 °C. Las proteínas se separaron en electroforesis SDS-PAGE en gel de acrilamida-bisacrilamida al 12%. Las proteínas fueron transferidas a PVDF por electrotransferencia semiseca, posteriormente la membrana se bloqueó con buffer de bloqueo BBS (15 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ +0.12M NaCl+0.25% BSA + 0.05 de Tween 20 + 1mM de EDTA, pH=8.5). Después se incubó con un anticuerpo primario anti-P.A en una dilución 1:3,000 en buffer BBS por dos horas a temperatura ambiente. Finalmente se incubó por una hora con un anticuerpo anti-ratón conjugado con HRP a una dilución 1:4,000 en buffer BBS. A la membrana se le agregaron 0.5 mL de la solución 1 y 2 del kit PIERCE ECL-Western Blotting Substrate y se reveló utilizando películas de rayos X en oscuridad.

4.3. Expresión de la proteína antigénica en *E. coli*

4.3.1. Expresión de las proteínas en *E. coli*

Para la cuantificación del rendimiento de cada línea transgénica o transplastómica es necesario contar anticuerpos específicos para la proteína, para ello fue necesario expresar a la proteína P.A en *E. coli*. El gen optimizado para la expresión en cloroplasto de P.A se clonó en el vector pET-28b, las construcciones se verificaron por PCR y secuenciación, con estas construcciones se transformaron células de *E. coli* BL21.

4.3.2. Purificación de la proteína P.A mediante columna de afinidad a níquel

Un cultivo de 500 mL a una OD_{600 nm} de 0.4, se indujo con 0.5 mM de IPTG y se incubó por 4 horas a 28° C. La biomasa fue colectada por centrifugación a 5,000 rpm a 4° C y fue tratada para el aislamiento de cuerpos de inclusión de acuerdo al protocolo descrito por Skala et al., (2013). El material insoluble se resuspendió en 10 mL de CH₃CN 6M pH= 7.8, NaCl 500 mM y Tris 50 mM. La solubilización se realizó por 24 h en agitación a 4 °C. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min, el sobrenadante se transfirió a la columna de níquel y se incubó por 2 horas en agitación. Para la purificación se utilizó el método híbrido recomendado por el sistema de purificación ProBond™ (No. Cat. K85001 Thermo Fisher Scientific). Para analizar la eficiencia de la purificación por columna de níquel se realizaron electroforesis en Tricine-SDS-PAGE (Schagger, 2006) o SDS-PAGE y Western Blot. Las fracciones fueron cuantificadas por el método de Bradford, se hizo un pool de las fracciones y se transfirió a un VivaSpin® de 10 kDa de tipo PES en donde se concentró la proteína y se cambió el buffer (Tris 50 mM, NaCl 40 mM y Glicerol al

10%). La proteína se cuantificó por ELISA indirecto, utilizando como anticuerpo primario anti-histidina 1:3,000 y un anticuerpo secundario anti-ratón unido a fosfatasa alcalina a una concentración 1:1,000 y para revelar se utilizaron 100 µL de solución 3 mM de p-nitrofenilfosfato, se incubó por una hora a temperatura ambiente. Finalmente, la placa se leyó a 405 nm.

4.3.3. Producción de anticuerpos contra P.A en ratones BALB/c

Debido a la necesidad de contar con un anticuerpo que detecte específicamente a la proteína P.A, se decidió realizar un ensayo de inmunización para la producción de anticuerpos policlonales en ratonas BALB/c de 12 semanas de edad. El protocolo fue aprobado por el comité de bioética para el cuidado y el uso de animales de investigación del IPICYT, con el folio No. 8. Los animales se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad (12 x 12 h) en cajas de policarbonato con tapas, cama de ecobed, alimento para múridos y agua estéril. Los animales se mantuvieron en una densidad máxima de 4 animales por caja en un equipo de alojamiento de tipo ALLENTOWN. Los grupos experimentales fueron: Grupo 1 (n=8) 5 µg de proteína P.A en buffer de tris (Tris-HCl 50 mM, pH= 8, NaCl 170 mM, glicerol al 10 %) y adyuvante incompleto de Freund; Grupo 2 (n=3) buffer de Tris y adyuvante incompleto de Freund; y el Grupo 3 (n=3) buffer de Tris. La primera inmunización fue subdérmica cercana a los ganglios inguinales, la segunda dosis se aplicó quince días después vía intraperitoneal. Al día 30 de la primera inmunización se tomó una muestra de sangre vía venofacial. Se separó el plasma por centrifugación (15 min a 2,500 rpm) con un sistema de vacío BD (Vacutainer). Se evaluó el título de anticuerpos policlonales a través de ELISA, la placa se sensibilizó con 125 ng de P.A producida en *E. coli* y se

realizaron diluciones seriadas de cada plasma de ratón, como anticuerpo secundario se utilizó anti-ratón IgG total acoplado a fosfatasa alcalina (1:1,000). Se realizó una colecta de 500 μ L de sangre de los ratones y se realizó un pool por grupo y se determinó el título, la especificidad y la afinidad de los anticuerpos producidos. Los ratones 1, 2, 3 y 6 fueron re-inmunizados vía intraperitoneal con 5 μ g de proteína P.A. Transcurridos 15 días se tomó una sangría de 30 μ L por ratón. Se analizó el título de los anticuerpos por ELISA. Debido a que los ratones poseían un buen título se tomaron sangrías de cosecha (500 μ L) y se hizo un pool del plasma. Los ratones fueron sacrificados con una solución de Ketamina (200 mg/Kg de peso) y Xilacina (10mg/ Kg de peso) inyectada vía intraperitoneal.

4.3.4. Caracterización de los anticuerpos policlonales

Al finalizar el ensayo de inmunización se obtuvieron tres lotes de plasma de los ratones inmunizados con la proteína P.A, los cuales fueron caracterizados mediante la técnica de ELISA. Primero se determinó el título de los anticuerpos IgG totales del pool, en seguida se realizó una curva estándar desde 3.9 a 125 ng de proteína P.A, la dilución del plasma fue 1:1,000 (lote 1), 1:4,000 (lote 2) y 1:30,000 (lote 3). Posteriormente, con un ELISA indirecto se caracterizaron los subtipos de inmunoglobulinas producidas en los diferentes lotes utilizando anticuerpos secundarios que reconocen IgG1, IgG2a, IgA e IgE acoplados a fosfatasa alcalina. Para determinar la afinidad de los anticuerpos a la proteína P.A, se realizó un ELISA fijando 125 ng de dos proteínas purificadas con colas de histidinas diferentes en su secuencia a P.A: SUMO (expresada en bacteria) y BP (expresada en planta) y la

proteína P.A, para determinar que la detección fuera específica; posteriormente se utilizó como anticuerpo primario el plasma de cada grupo (dilución 1:1,000) y como anticuerpo secundario anti-ratón IgG total. Los datos de las absorbancias se analizaron en el programa GraphPad Prism6.

La afinidad y la avidéz de los anticuerpos a la proteína P.A se analizó por Western Blot, para ello se cargó 1 µg de las proteínas SUMO, BP y P.A, utilizando como anticuerpo primario el plasma del grupo inmunizado con la proteína P.A.

4.3.5. Ensayos de microneutralización del suero de los ratones inmunizados con la proteína P.A

Para demostrar la capacidad inmunogénica de los anticuerpos producidos fue necesario realizar una prueba biológica para analizar la capacidad neutralizante de anticuerpos contra el virus de la influenza. Para ello fue necesario inactivar los sueros de los grupos P.A2, P.A3, Tris, Adyuvante y suero de ratones preinmunizados no tratados (N.T). Cada suero se diluyó de manera serial con un factor de dilución 1:2 en medio de infección (Medio MEM + 0.5 µg/mL de Tripsina-TPCK + 0.3% de BSA). A cada pozo se le adicionaron 100 TCID del virus Influenza pdm A/H1N1 2009, esta mezcla se dejó interactuar por una hora a 37 °C. También se colocó en cuatro pozos medio (control celular) y otros cuatro pozos con la dilución del virus (control viral). Pasado este tiempo de incubación se transfirió la mezcla a la monocapa celular confluyente de células MDCK y se incubó por 48 h a 37 °C.

El efecto citopático se observó a las 24 y 48 horas para cada dilución de los sueros, el control celular y el control viral. Para comprobar la presencia de nuevas

partículas virales en el sobrenadante, se tomó el sobrenadante de cada pozo y se tituló por hemaglutinación (procedimiento descrito anteriormente).

Para tener una mejor visualización del efecto citopático, la monocapa se fijó con 30 μ L de formaldehído al 10% y posteriormente se tiñó con cristal violeta. Estos experimentos se realizaron por quintuplicado y los resultados obtenidos de cada grupo se analizaron con un ANOVA de una vía ($\alpha=0.05$) y la comparación de medias de Tukey ($p < 0.001$). El análisis estadístico y los gráficos se realizaron en el software GraphPad Prism 6.

5. RESULTADOS

5.1. Péptido EB

5.1.1. Selección de transformantes de *C. reinhardtii* y detección de transgenes

El gen que codifica para el péptido EB se clonó en el vector pChlamy_1 y se confirmó mediante PCR y análisis de secuenciación. *C. reinhardtii* fue transformada con la construcción que contiene el gen del péptido EB usando *A. tumefaciens*. Las 10 microalgas transformadas putativas se cultivaron en TAP-higromicina durante múltiples generaciones. Se detectó un amplicón específico de 116 pb del transgén de EB en el genoma nuclear de tres microalgas resistentes (Fig. 4). No se observaron cambios en las características del fenotipo en comparación con las microalgas WT. Además, la línea transgénica a mostró características estables después de 4,000 generaciones y fue seleccionada para estudios descritos a continuación.

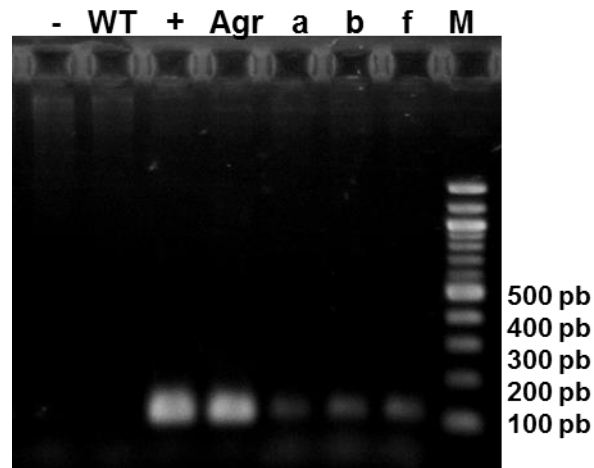


Figura 4. Ensayo de PCR para la detección del gen del péptido EB en microalgas transformadas en núcleo. Amplificación de un producto esperado de 116 pb correspondiente al gen EB de líneas transgénicas nucleares (a, b, f), (Agr): control positivo EB-pChlamy_1 purificado de *Agrobacterium tumefaciens*; (+): Control positivo EB-pChlamy_1 purificado de *E. coli*; (-): control negativo; (WT): ADN de cepa de tipo silvestre; (M) Marcador de peso molecular de ADN (escalera de 100 pares de bases).

El gen del péptido EB optimizado para la expresión en cloroplasto fue clonado en el vector p463 durante la investigación realizada para la tesis de maestría (Reyes-Barrera, 2016). Con esta construcción se logró transformar por biobalística a siete microalgas, que crecieron en medio selectivo TAP 100 mg/L de espectinomicina. A través de PCR se detectó el transgén el integrado en el genoma del cloroplasto de la microalga. Adicionalmente las microalgas transformadas mostraron que todas las copias del genoma del cloroplasto contenían la construcción, por lo tanto, se puede decir que son líneas homoplásticas (Reyes-Barrera, 2016).

5.1.2. Producción del péptido EB en *C. reinhardtii*.

El péptido EB se logró extraer con los amortiguadores de Tris y agua Mili Q de las microalgas transformadas después de eliminar la clorofila. La banda esperada del péptido EB se puede observar en mayor proporción en el extracto de proteína soluble total (PST) de las microalgas transformadas vía nuclear en comparación con la línea transformada vía cloroplasto, sin embargo, no se observó la banda en el PST de la microalga sin transformar (Fig. 5a). De acuerdo con los predictores bioinformáticos (herramienta ProtParam, Expasy) el tamaño esperado del péptido es de 3.4 kDa.

Para cuantificar la cantidad del péptido EB en los extractos de las microalgas transformadas, fue indispensable tener el anticuerpo policlonal anti-EB el cual se describe en la siguiente sección. Mediante el ELISA se determinó que la cantidad de EB en los extractos en agua MQ de la microalga transformadas nuclearmente contienen una cantidad 105.9 μg de EB por mL de extracto de proteína soluble total (PST). Por lo tanto, el porcentaje de EB expresado de manera nuclear representa el $4.99 \pm 0.067\%$ de PST (EB MQ). Mientras los extractos de Tris de la microalga transformada contienen 96 μg de EB por mL de PST, lo cual EB representa el $3.96\% \pm 0.046\%$ de PST (EB TRIS). En cuanto al rendimiento de la producción de péptidos recombinantes, *C. reinhardtii* produce 1.95 mg de EB por gramo de peso seco; por lo tanto, esto representa el 0.19% de la biomasa seca después de la extracción de clorofila.

La línea transplastómica mostró una cantidad de 0.13 µg de EB por mL de PST lo que representa un 0.013% ± 0.01% de PST. Particularmente, en las microalgas transplastómicas casi todo el péptido EB se obtiene solubilizando con urea 8 M en la fracción insoluble. Tomando a consideración que el péptido se requiere como una terapia profiláctica y que interactuarán con la mucosa nasal, es inviable utilizar el péptido extraído con urea de las microalgas transplastómicas. Por lo tanto, los siguientes ensayos se realizaron con los extractos de las microalgas transformadas en el genoma nuclear.

La presencia del péptido EB en los extractos se validó mediante transferencia Western usando un anticuerpo policlonal primario anti-péptido EB. En la Fig. 5b se muestra la banda de 3.4 kDa de extractos con agua MQ y Tris de microalgas transformadas, mientras que en los extractos de microalgas WT no se detectó señal.

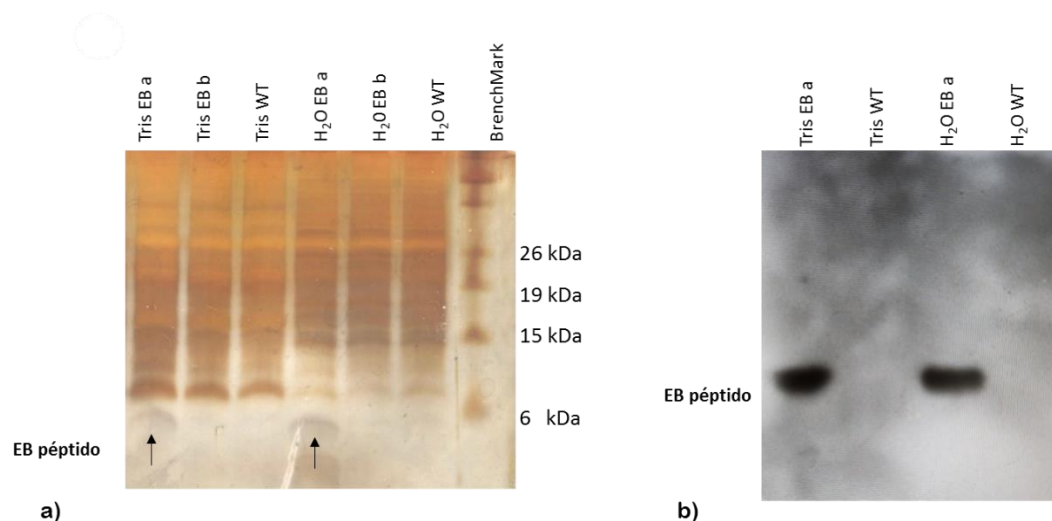


Figura 5. Detección de una banda estimada de 3.4 kDa en microalgas transformadas, correspondiente al péptido EB. a) Electroforesis de proteínas de microalgas transformadas y sin transformar. El péptido EB (tamaño estimado de 3.4 kDa) se observa en extractos de Tris y agua MQ de líneas de microalgas transformadas en el núcleo (EB a) y en el cloroplasto (EB b). b) Detección de péptido de Western Blot EB con un anticuerpo anti-EB en extractos de microalgas transformadas en el núcleo. Se muestran extractos de Tris y agua MQ EB de las microalgas transformadas, así como los extractos de Tris y agua MQ de las microalgas sin transformar (WT). (MQ): agua Mili Q.

5.1.3. Producción de anticuerpos para el péptido EB en ratones BALB/c.

La generación de anticuerpos se realizó mediante un ensayo de inmunización en ratones, en el cual a través de Dot Blot se monitoreó la producción de anticuerpos afines al péptido EB sintético, y como la señal era muy baja se determinó purificar el anticuerpo. El uso de las Dynabeads nos permitió acoplar en su superficie a EB y posteriormente purificar los anticuerpos específicos para EB del pool de suero de los ratones inmunizados. En los ensayos de Dot Blot con los anticuerpos purificados se mejoró la señal, y fue posible detectarla en las diluciones 1:250 y 1:500 (Fig. 6a). Con este resultado, procedimos a estandarizar las condiciones para el Western Blot y determinamos que es posible detectar 10 µg y 5 µg de antígeno. Esto nos indica que tenemos poca cantidad de anticuerpo contra EB (Figs. 6b y c).

La poca cantidad de anticuerpos producidos para el péptido EB está asociado a las características del antígeno. Una característica importante es que el tamaño es de 2.4 kDa, el cual es muy pequeño, por lo tanto, algunas veces se pueden unir a las células B, pero no pueden unirse simultáneamente a la proteína del MHC de clase II y al receptor de las células T. Se recomienda que, para poder tener una buena producción de IgG, el antígeno pueda ser acoplado al MHC de clase II y a la vez al receptor de la célula T, o acoplar al péptido a una molécula acarreadora antes de la inmunización. Elementos exógenos también pueden ayudar a forzar el sistema inmune para poder producir anticuerpos, como es el aumentar la dosis del antígeno y el uso de adyuvantes. El uso de adyuvante Gold TiterMax que contiene Copolímero CRL-8300, escualeno y monolito de sorbitán, permite ayudar al reconocimiento por las células dendríticas periféricas y el bazo de ratón y por lo tanto lo usamos en este trabajo (Greenfield, 2014).

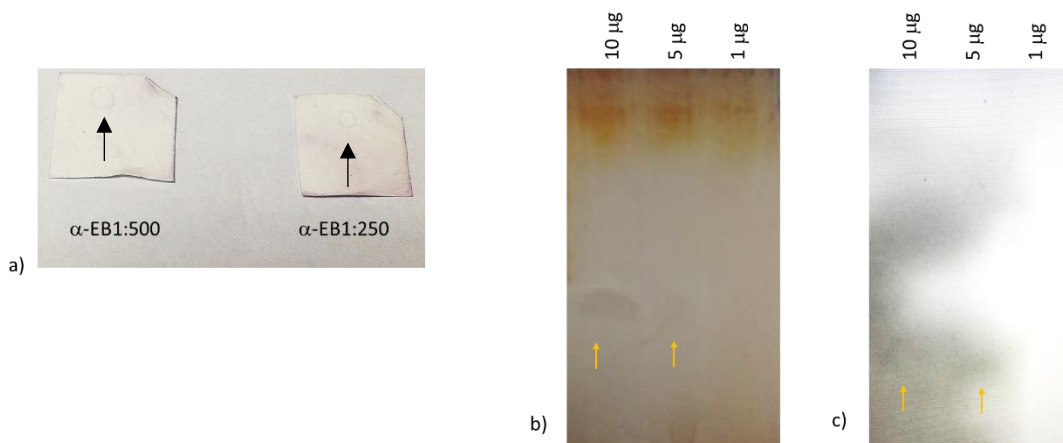


Figura 6. Identificación de los anticuerpos producidos específicos al péptido EB. a) Dot Blot para la detección de los anticuerpos específicos para EB producidos en ratones, la señal cromogénica es más fuerte en dilución del anticuerpo 1:250 versus 1:500. b) Electroforesis Tricina-SDS-PAGE para visualizar las diferentes cantidades (1-10 μg) de péptido EB. Las flechas amarillas indican al péptido EB. c) Detección del péptido EB por Western Blot, solo se observa señal en el los carriles que contienen 10 μg y 5 μg del péptido.

5.1.4. Ensayos de citotoxicidad en células MDCK.

Los ensayos de citotoxicidad realizados en la línea celular MDCK, nos muestra el porcentaje de daño que causan los extractos en la monocapa celular. La citotoxicidad del péptido se ensayó mediante cambios en la viabilidad celular, usando un ensayo de reducción de MTT. La viabilidad celular no disminuyó en presencia del péptido sintético EB y los extractos de microalgas EB o WT. Estos grupos no presentaron diferencias significativas con respecto al control (medio solo) en todas las concentraciones ensayadas (0.3, 3 y 30 μg de proteína; Fig. 7). En consecuencia, probamos hasta 50 μg de péptido y no se mostró un efecto citotóxico en las células MDCK.

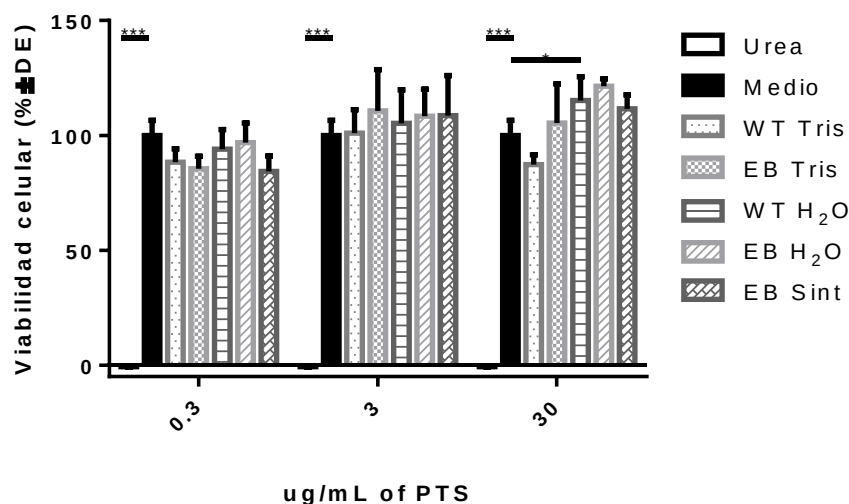


Figura 7. La viabilidad celular no se ve afectada por los extractos de alga que contiene EB. Los extractos en agua MQ y Tris de algas que producen EB y algas WT y el péptido sintético EB (0.03, 3 y 30 µg/ mL) no disminuyeron la viabilidad celular en comparación con control (células creciendo en medio MEM) ($p < 0.001$, ANOVA). Prueba de comparaciones múltiples de Dunnett ($*** = 0.001$; $* = 0.1$). El porcentaje de viabilidad celular se determinó mediante reducción de MTT. Se usó urea (4 M) como control de la reducción de la viabilidad celular, y se usó medio MEM como control en donde no hay daño en la viabilidad celular. (MQ): extractos de agua Mili Q; (TRIS): extractos de Tris Buffer; (SD): desviación estándar; (TSP): proteína soluble total.

5.1.5. Determinación de la actividad inhibitoria de la fusión del virus del péptido EB.

El ensayo de inhibición de la hemaglutinación nos permite determinar si el péptido es capaz de unirse a la hemaglutinina viral, por lo tanto, se preverá la interacción entre la hemaglutinina y el ácido N-acetilmurámico de las glicoproteínas que se encuentran en la superficie del eritrocito humano. Con este ensayo podemos evaluar con que concentración del péptido (expresado en algas y del péptido sintético) se inhibe la fusión mediada por hemaglutinina.

La curva de dosis-respuesta mostró que los extractos de alga que contienen a EB y el péptido sintético pueden inhibir de una manera dosis-dependiente la

hemaglutinación de eritrocitos producida por el virus de la influenza pdm y Virginia. Para la cepa de influenza pdm, la IC_{50} fue menor para el EB expresado en microalgas (2.202 ± 1.027 nM para el extracto de EB MQ y 9.582 ± 1.027 nM para el extracto de EB Tris) que para el péptido sintético EB (256.3 ± 1.03 nM; Fig. 7a; Tabla 3). Esto indica que el EB producido en las algas es 100 veces más eficaz que el péptido sintético. Otro hecho interesante es que los extractos de agua MQ y Tris de las algas sin transformar no pueden inhibir la unión entre la hemaglutinina y su receptor.

En el ensayo de inhibición de la hemaglutinación de la influenza cepa Virginia, extracto de EB tris mostró un IC_{50} de 2.338 ± 1.032 nM y EB MQ tiene 4.388 ± 1.01 nM, mientras que el péptido sintético EB mostró una IC_{50} valor de 613.8 ± 1.043 nM (Fig. 7b; Tabla 3). Nuevamente, el péptido EB expresado en algas es más eficaz que el péptido producido sintéticamente. Observamos que los extractos de microalgas sin transformar (WT) no muestran la capacidad para inhibir la unión hemaglutinina-ácido siálico.

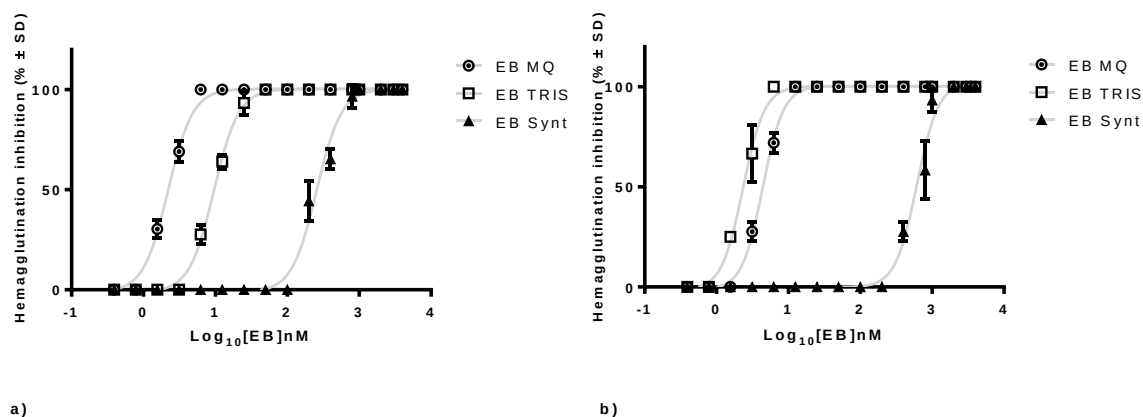


Figura 8. EB inhibe la unión de la hemaglutinina viral a su receptor. EB expresado en microalgas y el EB sintético inhibieron la hemaglutinación viral. Las curvas de dosis-respuesta de cada péptido muestran la capacidad de la EB para prevenir la unión de la hemaglutinina viral al ácido siálico en la membrana de los glóbulos rojos. a) Efectos inhibidores de EB frente a la cepa influenza pdm A / H1N1. b) Efecto inhibidor de la EB contra a la cepa de influenza A H1N1 Virginia/ ATTC/2009. El gráfico muestra la inhibición de la hemaglutinación media en porcentaje para cada EB $\pm$ SD. Los resultados pertenecen a tres ensayos

independientes. (MQ): extractos de agua Mili Q; (TRIS): extractos de Tris Buffer. (SD) desviación estándar.

Tabla 3.- Inhibición de la hemaglutinación por el virus de la influenza promovida por el péptido EB.

Cepa Viral	Muestra	IC₅₀ nM Promedio ± DE
A H1N1 pdm	EB extracto MQ	2.202 ± 1.027
	WT extracto MQ	0
	EB extracto TRIS	9.582 ± 1.027
	WT extracto TRIS	0
	EB sintético	256.3 ± 1.03
A H1N1 Virginia	EB extracto MQ	4.388 ± 1.01
	WT extracto MQ	0
	EB extracto TRIS	2.338 ± 1.032
	WT extracto TRIS	0
	EB sintético	613.8 ± 1.043

La cantidad probada de EB para inhibir la hemaglutinación de 64 unidades hemaglutinantes de virus fue de 0 a 4,000 nM. Los resultados mostrados pertenecen a tres ensayos independientes. El IC₅₀ y la desviación estándar (DE) se determinó a través de una curva dosis respuesta.

5.1.6. Propagación de los stocks virales del virus de la influenza A H1N1.

Para probar la efectividad inhibitoria del virus de la influenza de los péptidos, primero fue necesario hacer las pruebas biológicas con el virus de influenza para demostrar su capacidad infectiva. Para la propagación de las cepas pandémicas y Virginia se determinó que con MEM 1X, 0.5 µg de Tripsina TPCK y 0.3% de BSA se producían una mayor cantidad de Unidades Hemaglutinantes y se mantenía la integridad de la

monocapa celular por más tiempo, lo que asegura una correcta producción de partículas infectivas del virus de la influenza.

Los títulos virales del stock de trabajo de los virus se obtuvieron por la determinación de las unidades formadoras de placas (PFU) y la dosis infectiva en cultivo celular al 50% (TCID₅₀).

En análisis de PFUs puede determinar la capacidad del virus de la influenza para formar placas líticas en la monocapa celular. Cada placa lítica deriva del efecto citopático causado a un grupo de células vecinas por la internalización de una partícula viral infectiva a una célula. Las PFUs son medidas cuantitativas de la cantidad de virus infecciosos en una muestra viral (Kawaoka, 2018). Con esta técnica determinamos los títulos de dos lotes de virus pandémico, el primer lote contiene 4.9×10^{10} PFU /mL, el segundo lote contiene 1.45×10^8 PFU /mL. Mientras que el número de partículas infecciosas para la cepa Virginia es 6.2×10^8 PFU /mL (Fig. 8).

La titulación por TCID₅₀ suele utilizarse para determinar la dilución de la muestra del virus que es requerida para producir un daño citopático positivo en un porcentaje del 50%. Esta técnica tiene la ventaja de ser menos afectada por las variaciones dentro de los experimentos de titulación (Balish, 2013). Los títulos de nuestros virus fueron los siguientes: para el virus pandémico el lote uno tuvo $10^{7.5}$ ID₅₀/mL y el lote dos $10^{6.69}$ ID₅₀/mL; mientras que para el virus Virginia se obtuvo un título de $10^{6.18}$ ID₅₀/mL.

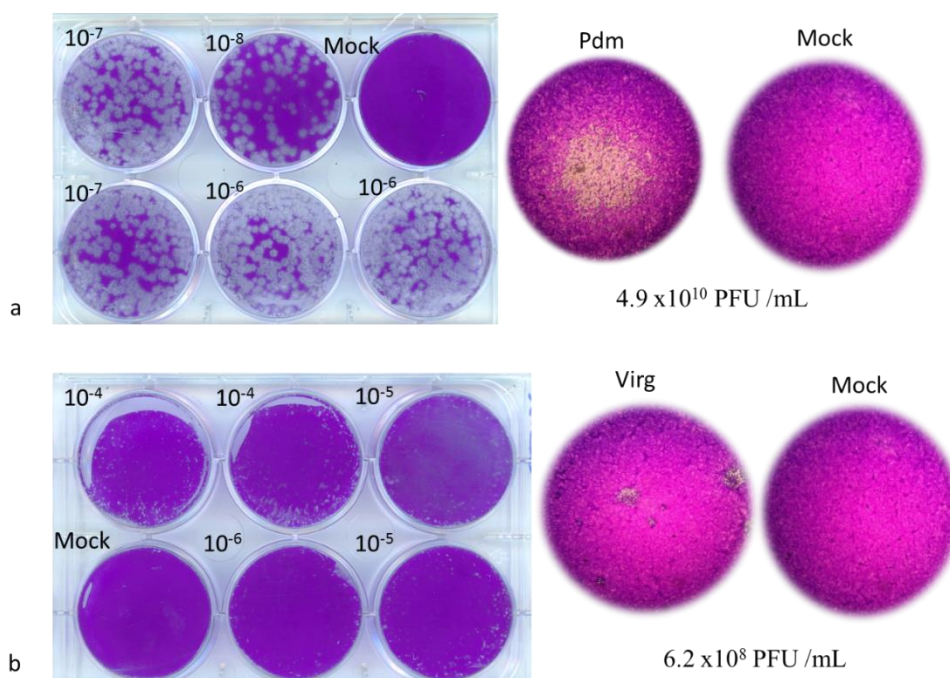


Figura 9. Ensayo de titulación viral por ensayo unidades formadoras de placas líticas (PFUs). Las placas líticas por pozo se pueden observar como zonas concéntricas donde las células se lisaron. Estas placas líticas se pueden ver de manera macroscópica. a) Placas líticas formadas por el la cepa pandémica del virus de la influenza y el título viral del lote de trabajo. b) Placas líticas formadas por la cepa Virginia del virus de la influenza y el título viral del lote de trabajo.

5.1.7. Determinación de la actividad inhibitoria de la replicación viral del péptido EB

El ensayo de inhibición de la replicación viral nos permitió evaluar la capacidad del péptido EB para inhibir la entrada del virus de la influenza H1N1 a la célula MDCK. El péptido sintético, así como los extractos de alga que contienen a EB mostraron capacidad para inhibir la replicación, mientras que los extractos de microalgas no transformados no mostraron protección contra la replicación viral (Tabla 4).

El IC_{50} se refiere a la concentración inhibitoria del péptido en el cultivo celular requerido para inhibir el efecto citopático en un 50%, el cual puede ser traducido en la capacidad para inhibir la entrada del virus a la célula. La curva dosis-respuesta muestra una reducción de la infección viral cuando aumenta la cantidad de EB (Fig.

10). Tanto EB expresado en microalgas y el péptido sintético EB inhibió la replicación viral, pero en la comparación de la IC_{50} entre los péptidos, se determinó que es necesario 36 veces menos cantidad de extractos EB (20.71 ± 1.03 nM) que del péptido sintético EB (754.4 ± 1.02 nM) para inhibir la replicación viral (Tabla 4). Se puede concluir que la EB previene la replicación del virus porque no detectamos nuevas partículas virales (por ensayo de hemaglutinación) en el sobrenadante de los pocillos sin efecto citopático. Es importante resaltar que si bien los valores de IC_{50} son inferiores a los reportados por Jones et al. (2006), aquí usamos glóbulos rojos humanos en lugar de glóbulos rojos de pollo, que pueden afectar la actividad de hemaglutinación de los virus, ya que existen patrones de expresión específicos en restos de ácido siálico con enlaces 2,3 y 2,6 en las superficies de los glóbulos rojos (Eisfeld et al., 2014). Además, utilizamos diferentes cantidades de multiplicidad de infección (MOI) (0.001 frente a 0.01). La medida de MOI se refiere a la relación de virus usada por número de células, por ejemplo nosotros utilizamos una partícula viral infectiva por cada 1,000 células de mamíferos

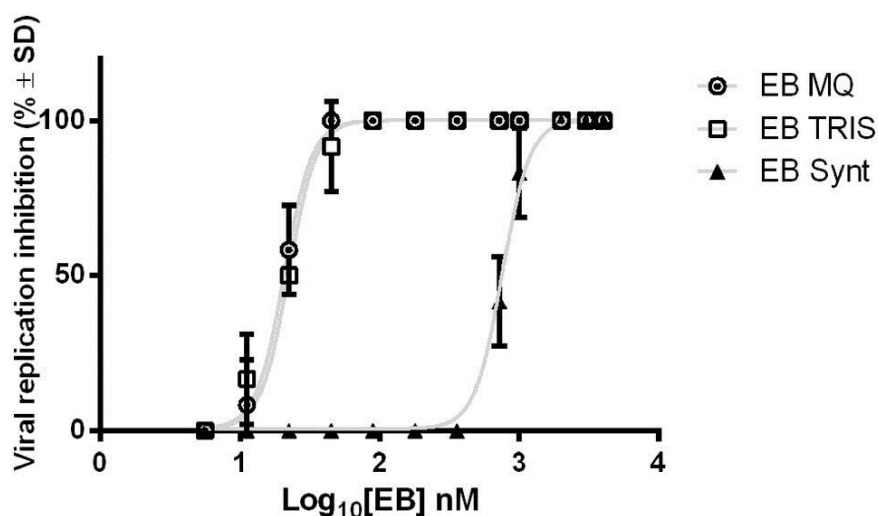


Figura 10. Efecto antiviral de EB expresado en microalgas y EB sintético. El EB expresado en microalgas y el EB sintético pueden inhibir la replicación viral de virus de la influenza pdm en células MDCK. Las curvas de dosis-respuesta de cada péptido muestran la capacidad de EB para prevenir la replicación de 100 TCID₅₀ de Influenza pdm A/H1N1. En el gráfico, se aprecia el porcentaje promedio $\pm$ desviación estándar (SD) de la inhibición de la replicación viral para cada

concentración de EB. Los resultados pertenecen a dos ensayos independientes. (MQ): extractos de agua Milli Q; (TRIS): extractos de Tris Buffer.

Tabla 4.- Inhibición de la replicación viral por el péptido EB

Cepa viral	Muestra	IC₅₀ nM Media ± DE
A H1N1 pdm	EB extracto MQ	20.71 ± 1.031
	WT extracto MQ	0
	EB extracto TRIS	21.25 ± 1.030
	WT extracto TRIS	0
	EB sintético	754.4 ± 1.026

La cantidad probada de EB para inhibir la hemaglutinación de 64 unidades hemaglutinantes de virus fue de 0 a 4,000 nM. Los resultados mostrados pertenecen a dos ensayos independientes. El IC₅₀ y la desviación estándar (DE) se determinó a través de una curva dosis respuesta.

5.2. Proteína antigénica expresada en microalgas.

5.2.1. PCR de las transformantes de *C. reinhardtii*

Las microalgas transformadas vía nuclear fueron capaces de integrar en su genoma el transgén que codifica la proteína antigénica (Fig. 11a) sin modificar sus características fenotípicas; además, la línea transgénica es estable por 4,000 generaciones. Por otro lado, siete líneas de microalgas transformadas vía biobalística mostraron la integración del transgén que codifica la proteína antigénica (Fig. 11b) al genoma del cloroplasto. Después de seis rondas de selección se obtuvieron líneas homoplásticas (Fig. 11c). Esto demuestra la integración de la construcción en la región *tscA* bajo la regulación de gen *psaA*.

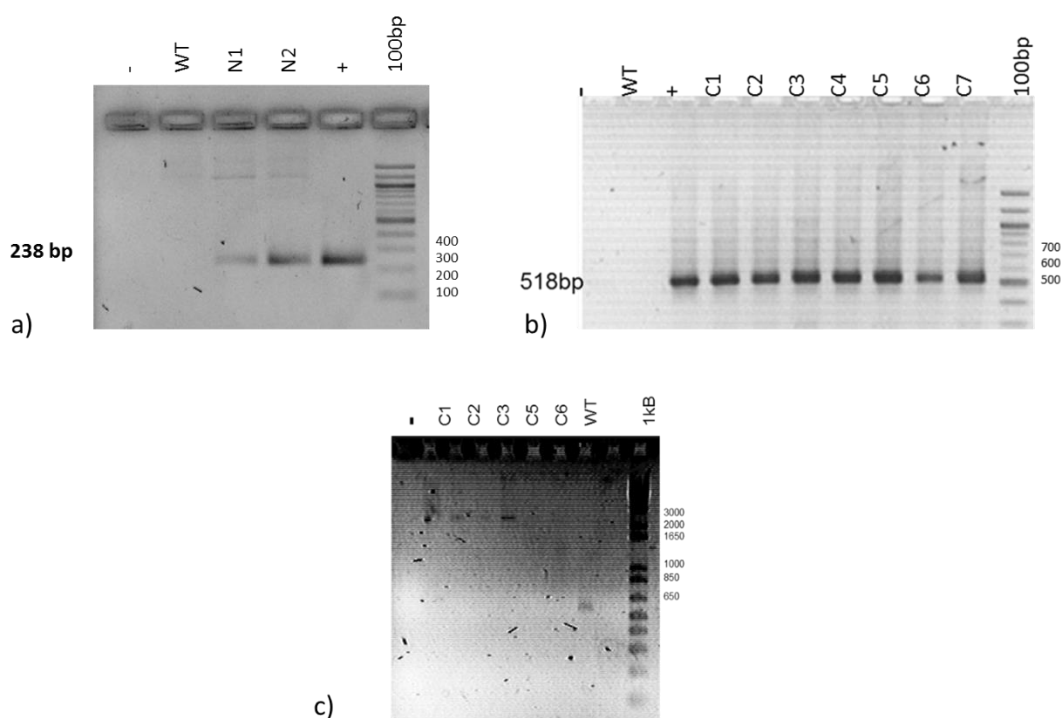


Figura 11. Confirmación de la integración del transgén en líneas transgénicas y transplastómicas de microalgas. a) Amplificación por PCR de un producto de 238 pb del gen P.A en las líneas transgénicas nucleares (N1 y N2), (+) P.A-pChlamy, (-) control negativo y (WT) cepa sin transformar. b) Amplificación por PCR de un producto de 518 pb del gen P.A en las líneas transplastómicas (C1-C7), (+) P.A-p463. c) PCR para comprobar homoplasstía, los amplicones de 2.9 Kb confirman el tamaño de la inserción en el genoma del cloroplasto, mientras que los no transformados (WT) amplifican un producto de 600 pb.

5.2.2. Western Blot de transformantes de *C. reinhardtii*

El peso molecular de la proteína antigénica P.A determinado por el programa “Protparam” (<http://web.expasy.org/protparam/>) es de 33.4 kDa. En el Western Blot y la electroforesis de proteínas se observa una banda con un peso aproximado al predicho en los extractos totales de las algas transgénicas, el cual se encuentra en el mismo tamaño que la P.A expresada y purificada de *E. coli* (estrategia mostrada en la siguiente sección). La presencia de la proteína P.A se corrobora en ambas líneas transgénicas (N1 y N2) debido a que para el Western Blot se utilizó un anticuerpo específico anti-P.A, mientras que en la microalga sin transformar no se observa ninguna señal (Fig. 12).

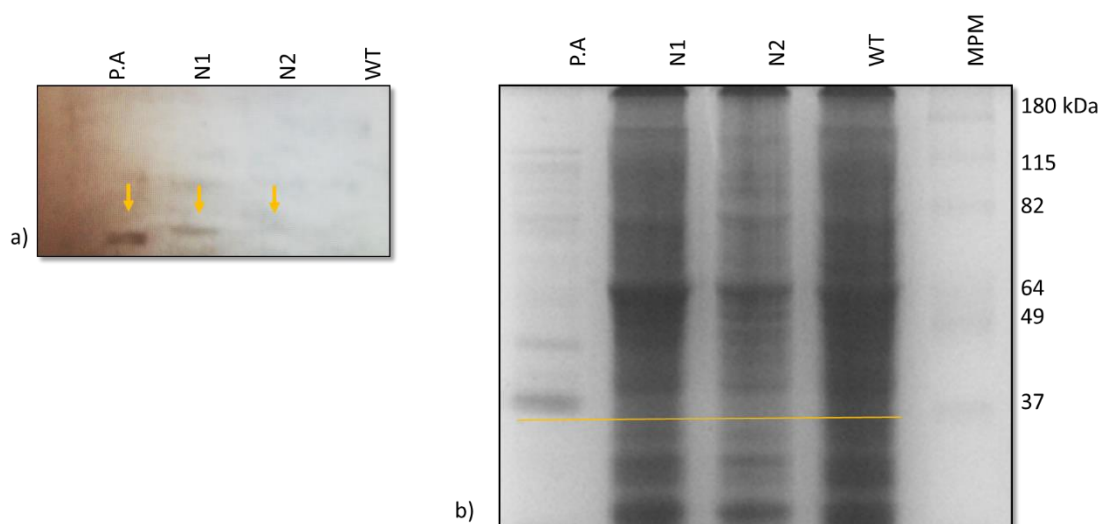


Figura 12. Detección de la proteína P.A en los extractos de proteína soluble total de las líneas transgénicas. a) Western Blot para la identificación de la proteína P.A en los extractos solubles totales de las líneas transgénicas (N1 y N2) y de la cepa sin transformar (WT), como control positivo se utiliza la P.A producida y purificada en *E. coli*. Las flechas amarillas indican la presencia de la proteína P.A. b) Electroforesis de proteínas de los extractos de algas. La línea amarilla indica a la banda diferencial, la cual corresponde al mismo peso de la proteína P.A producida y purificada en *E. coli*.

En los extractos de proteína soluble total de las líneas transplastómicas (C1 y C2) el anticuerpo anti-P.A detectó una banda, la cual se encuentra a la misma posición con respecto a la proteína control (P.A expresada y purificada de *E. coli*). Por otro lado, no se observa presencia de alguna señal en las proteínas totales de la microalga sin transformar (Fig. 13).

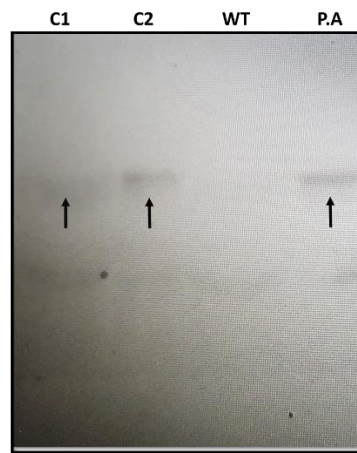


Figura 13. Detección de la proteína P.A en los extractos de proteína soluble total de las líneas transplastómicas. Western Blot para la identificación de la proteína P.A en los extractos totales de las líneas transplastómicas (C1 y C2) y de la cepa sin transformar (WT), como control positivo se utiliza la P.A producida y purificada en *E. coli*. Las flechas indican la banda detectada con el anticuerpo anti-P.A.

5.3. Proteína antigénica expresada en *E. coli*

5.3.1 Expresión y purificación de P.A en *E. coli* BL21

Para poder calcular los rendimientos de cada línea transgénica y transplastómicas de la microalga, es necesario contar con anticuerpos específicos para P.A, una estrategia para lograrlo es a través de la inmunización de ratones BALB/c con las proteínas recombinantes purificadas producidas en bacterias. La proteína antigénica, al inducirse con IPTG, solo se observa en la fracción insoluble (Fig. 14). Cuando una proteína recombinante se expresa en altas cantidades forma cuerpos de inclusión en el citoplasma bacteriano. Sin embargo, la proteína extraída de la fracción insoluble tiene la ventaja de aislarse fácilmente, se ha reportado que en ocasiones la solubilización puede ayudar a recobrar su forma estable y activa (Rinas et al., 2017).

El aislamiento de cuerpos de inclusión de la biomasa inducida en *E. coli* permite disminuir la cantidad de proteínas contaminantes en el proceso de purificación por columna de níquel. Este procedimiento permite la recuperación del 95% de proteína recombinante cuando es de naturaleza insoluble (Rodríguez-Carmona et al., 2010; Skala et al., 2013), por tal motivo se observó un aumento en la cantidad de proteína P.A purificada, llegando a obtener fracciones con un rendimiento de 2 mg/mL, lo que le permitió ser visualizada en las electroforesis de proteínas y en el Western Blot (Figs. 14b y c). Las fracciones se concentraron y se dializaron un VivaSpin® de 10 kDa de tipo PES. El análisis por ELISA indicó que se obtuvo 367.2 µg/mL y la estabilidad de la proteína se analizó por SDS-PAGE-Tricina y Western Blot (Figs. 14d y e).

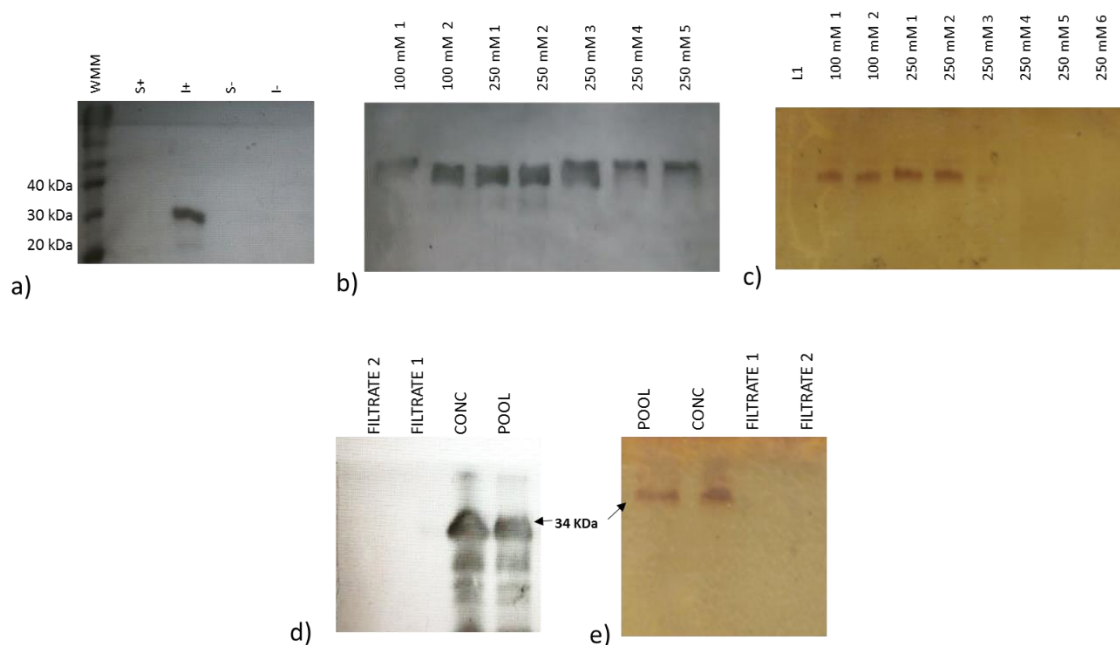


Figura 14. Western Blot de la proteína antigénica producida en bacteria purificada y concentrada. a) Identificación de la proteína antigénica de 34 kDa por Western Blot (con anticuerpo anti-histidina) en la fracción insoluble inducida con IPTG (I+), en las otras fracciones no se observa señal (Soluble inducida S+, Soluble no inducida S-, e Insoluble no inducida I-); b) Identificación de la proteína antigénica en diferentes fracciones de elución de la purificación por cuerpos de inclusión; c) Electroforesis de proteínas en un gel SDS-PAGE TRICINA teñido con plata, elución del buffer de lavado (L1), fracciones de elución de imidazol 100 mM (1, 2) fracciones de elución de imidazol 250 mM (1-6); d) Identificación de la proteína antigénica por Western Blot en la fracción concentrada de proteína proveniente de los cuerpos de inclusión; e) Identificación de la proteína antigénica purificada de los cuerpos de inclusión por SDS-PAGE-Tricina al concentrarse en el Vivaspín®.

5.3.2. Producción de anticuerpos policlonales en ratones BALB/c

La proteína antigénica (producida en *E. coli*) inmunizada por vía subcutánea/intraperitoneal tiene la capacidad de producir anticuerpos IgG. El ensayo por ELISA del plasma muestra una mayor producción de anticuerpos en el grupo inmunizado con la proteína P.A, dicho grupo es significativamente diferente con el grupo 2 (buffer Tris-Adyuvante) y al grupo 3 (buffer Tris). Este comportamiento se observa en los tres lotes de sueros tomados de los ratones

inmunizados con la proteína P.A (Figs. 15a, b y c). El título de anticuerpos IgG del lote 1 y 2 es de 1:32,000, mientras que el del lote 3 (ratones reinmunizados tres veces) es de 1:320,000. La curva estándar realizada con el suero de los ratones muestra una linealidad y en la mayoría de los casos tiene un ajuste de $R^2=0.97$, por lo tanto, el suero puede ser utilizado para cuantificar a la proteína P.A en inmunoensayos.

Como prueba de concepto, la inmunización de la proteína P.A producida en bacteria nos puede ayudar a dilucidar el tipo de respuesta humoral que podemos obtener con nuestro diseño de vacuna. La mejor respuesta tanto para IgG1, IgG2a e IgA se obtiene cuando los ratones son inmunizados en tres ocasiones (PA^3), seguido por el grupo que fue inmunizado dos veces (PA^2 y PA^1). Mientras que los grupos controles Tris y Tris-Adyuvante no incrementaron la producción de anticuerpos (Figs. 16a, b y c). La inducción de IgG1 en el grupo PA^3 es seis veces mayor que grupo PA^2 . En la producción de IgG2a en el grupo PA^3 es tres veces mayor que en el grupo PA^2 . En cuanto a la obtención de IgA, solo se observa cuando se realiza una tercera inmunización. El aumento del título de anticuerpo en el lote 3 perteneciente a los ratones re-inmunizados, está asociado a que los refuerzos tienen la capacidad de re-estimular al sistema inmune y aumentar la cantidad de anticuerpos circulantes; además, esta acción también permite la selección de células B por lo tanto a una producción de anticuerpos con mayor afinidad (Stills, 2005; Stills, 2012)

La inmunoglobulina E (IgE) permite mediar las reacciones anafilácticas durante las enfermedades alérgicas (Wu y Scheerens, 2014). Es recomendable que una vacuna no produzca IgE. Mediante ELISA se puede detectar cambios significativos en la cantidad de IgE en el suero de los ratones pre y post-inmunización. En general en este trabajo, no se observa algún incremento en la cantidad de IgE después de la inmunización de los diferentes grupos inmunizados lo cual es recomendable (Fig. 16e). Este tipo de anticuerpos se pueden generar de manera inadecuada contra antígenos del medio ambiente. En sangre, este tipo de

inmunoglobulina tiene una baja abundancia (50-200 ng/mL de sangre) pero estos suelen elevarse en una reacción alérgica (Wu y Zarrin, 2014).

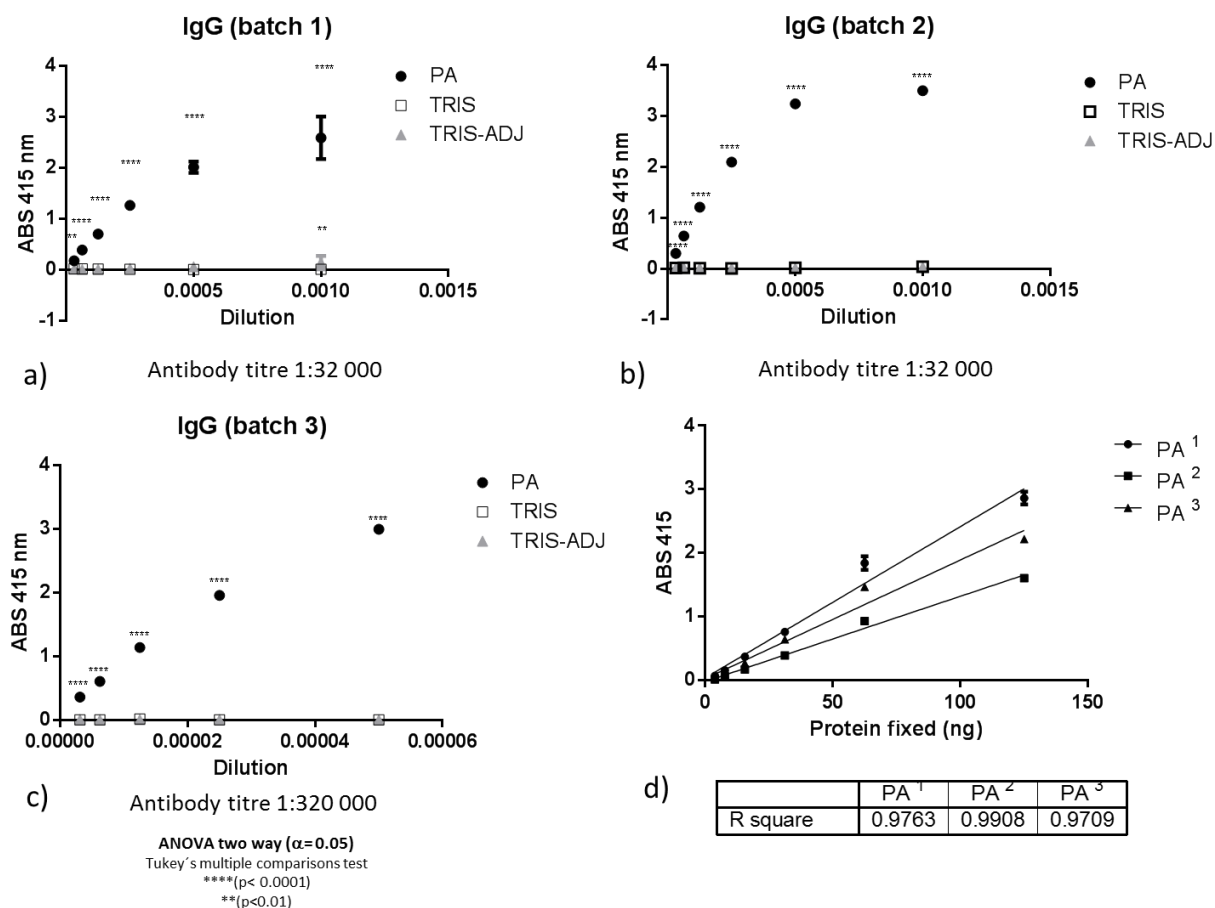


Figura 15. Determinación del título de anticuerpos de los grupos experimentales. a) Titulación de los anticuerpos IgG del plasma del lote 1, comparación entre las absorbancias de los sueros de los grupos experimentales por ANOVA de dos vías ($\alpha = 0.05$). Prueba de comparación de medias de Tukey's **** ($p < 0.0001$) y ** ($p < 0.01$); b) Titulación de los anticuerpos IgG del plasma del lote 2; c) Titulación de los anticuerpos IgG del plasma del lote 3; d) Curvas estándar de cada lote de plasma de ratones inmunizados con P.A, además se muestra el valor de la R^2 para cada una de las regresiones lineales.

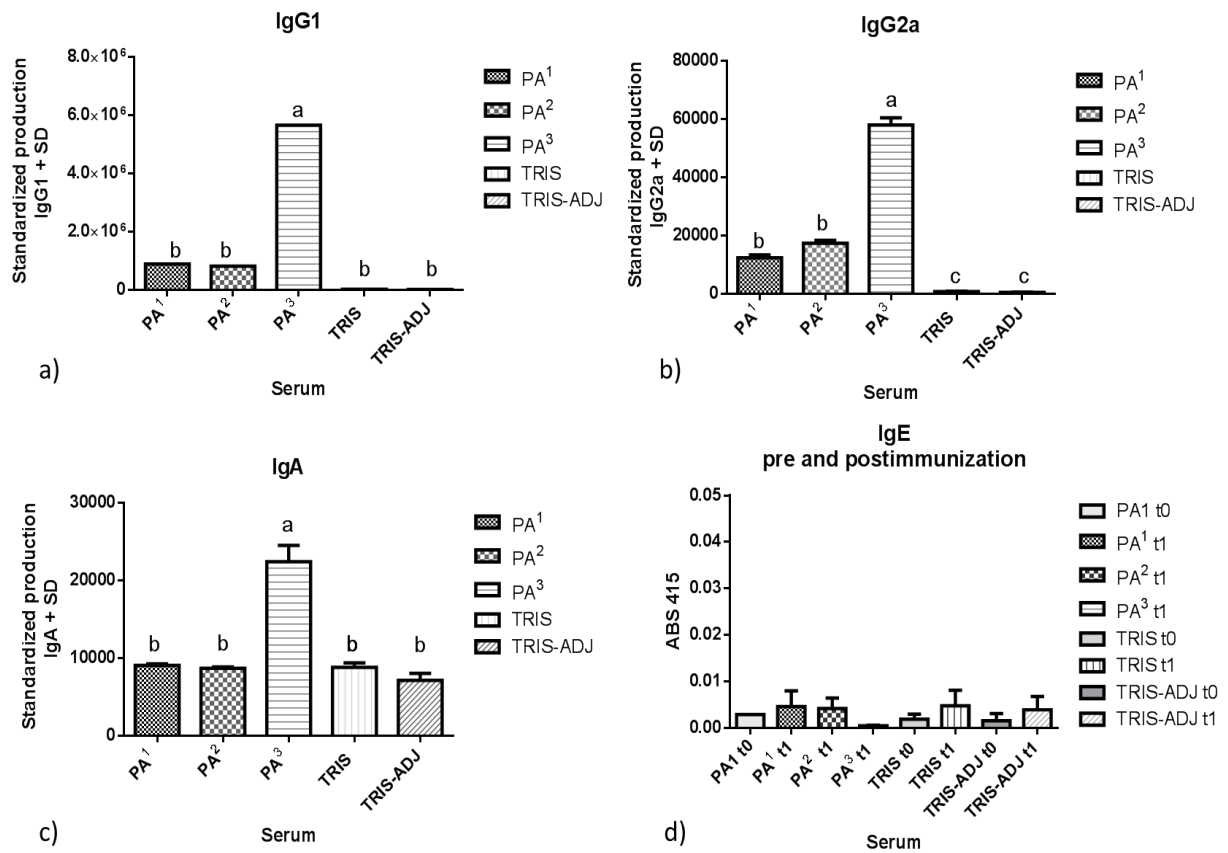


Figura 16. Cuantificación de los subtipos de inmunoglobulinas de los sueros de los grupos experimentales. a) Producción estandarizada de IgG1 de los grupos experimentales con respecto al suero de los ratones pre-inmunizados; b) Producción estandarizada de IgG2a; c) Producción estandarizada de IgA, d) Determinación de la producción IgE. ELISA del suero de los grupos experimentales antes de inmunizar (t0) y posterior a la inmunización (t1). La comparación de los grupos experimentales se realizó por ANOVA de dos vías ($\alpha = 0.05$) Prueba de comparación de medias de Tukey's (95% de confianza).

5.3.3. Análisis de especificidad del anticuerpo anti-P.A

Para la purificación de la proteína P.A fue necesaria una etiqueta corta de aminoácidos que permitan reducir el riesgo de alterar las propiedades intrínsecas de las proteínas recombinantes. Una de las etiquetas más populares es la etiqueta de histidinas, la cual tiene afinidad al níquel lo que permite hacer una purificación selectiva (Pogge von Strandmann et al., 1995). Por tal razón a nuestra proteína P.A se le incluyó una etiqueta de histidina. Para demostrar que no se generan anticuerpos contra la cola de histidina, se determinó por ELISA que todos los lotes de plasma de los ratones inmunizados con nuestra proteína antigénica no fueron capaces de reconocer a otras proteínas con etiqueta de histidina, tales como BP (producida en planta donada por la M.C. María Teresa Esquivel) y SUMO (producida en bacteria donada por el Dr. Samuel Lara) (Fig. 17a).

En el análisis por Western Blot utilizando anticuerpo comercial anti-histidinas, se observa la señal de todas las proteínas con la etiqueta de histidinas (Fig. 17c). Al compararlo con el Western Blot con el antisuero a P.A se observa que solo es capaz de reconocer a la proteína P.A pues no detecta a PTF (proteína donada por Karla Sánchez), BP y SUMO, que tienen etiqueta de histidinas (Fig. 17d y e). Esto confirma que no se produjeron anticuerpos contra la etiqueta de histidinas al inmunizar con la proteína P.A. La etiqueta de 6X His por sí sola es pobremente inmunogénica, y solamente lo es si se conjuga con proteínas acarreadoras como KLH (Costa et al., 2014; GenScript, 2018;), o al fusionarla al amino terminal de un péptido XDCoH (Pogge von Strandmann et al., 1995).

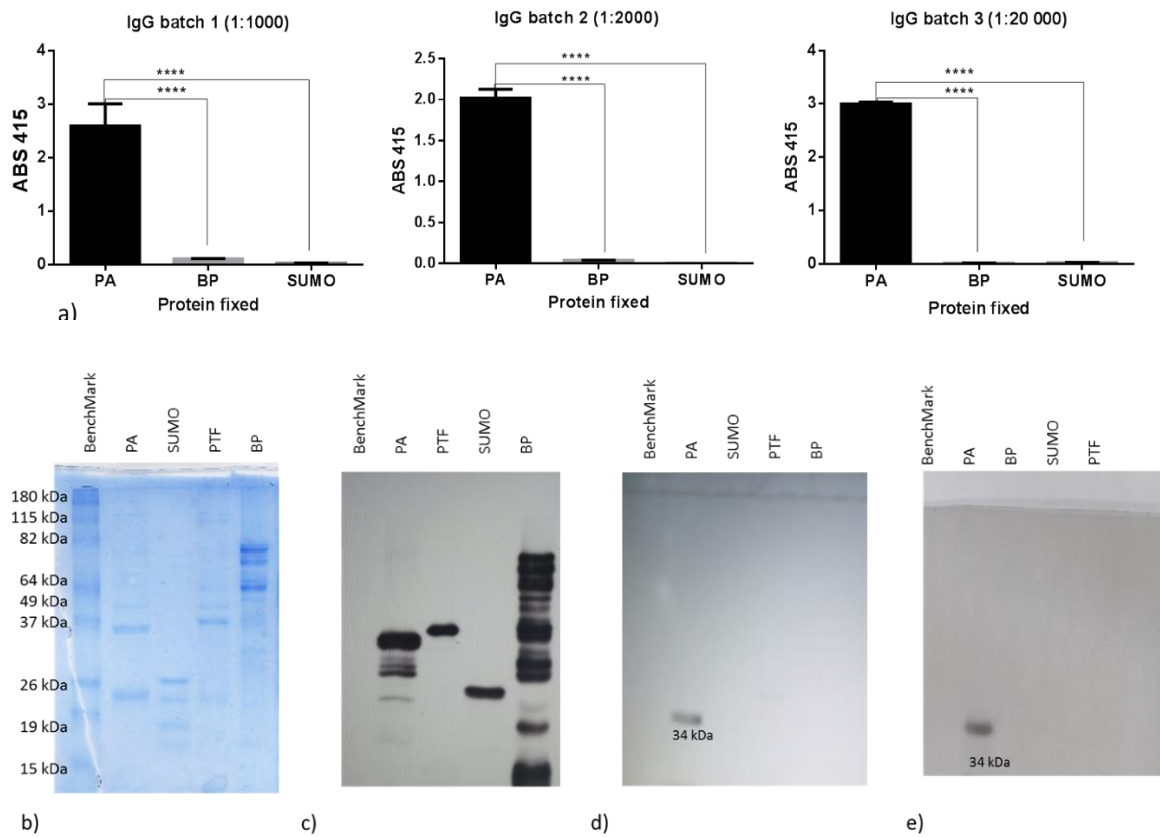
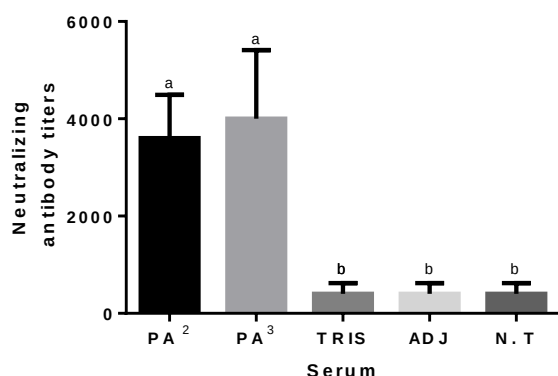


Figura 17. Evaluación de la producción de anticuerpos específicos contra P.A
a) Determinación de la producción de anticuerpos específicos contra P.A por ELISA. Los tres lotes de plasma obtenidos de los ratones inmunizados con la proteína P.A se analizaron a las diluciones óptimas para evaluar si eran inespecíficos y detectaban a la etiqueta de histidinas en otras proteínas con esta misma etiqueta (SUMO y BP). Se comparó la absorbancia entre los grupos con una ANOVA de una vía ($\alpha = 0.05$) y la comparación de medias de Tukey's nos indica que solo hay diferencias significativas de **** ($p < 0.0001$) entre P.A y BP, así como entre P.A y SUMO, demostrando que los anticuerpos son específicos vs P.A; b) Electroforesis en acrilamida de las proteínas purificadas con etiqueta de histidinas; c) Western Blot con anticuerpo anti-histidinas para detectar a las proteínas con etiqueta de histidinas; d) Western Blot con el antisuero P.A del lote 1 para detectar a la proteínas P.A; e) Western Blot con el antisuero P.A del lote 3 (re-inmunizados) para detectar a la proteínas P.A.

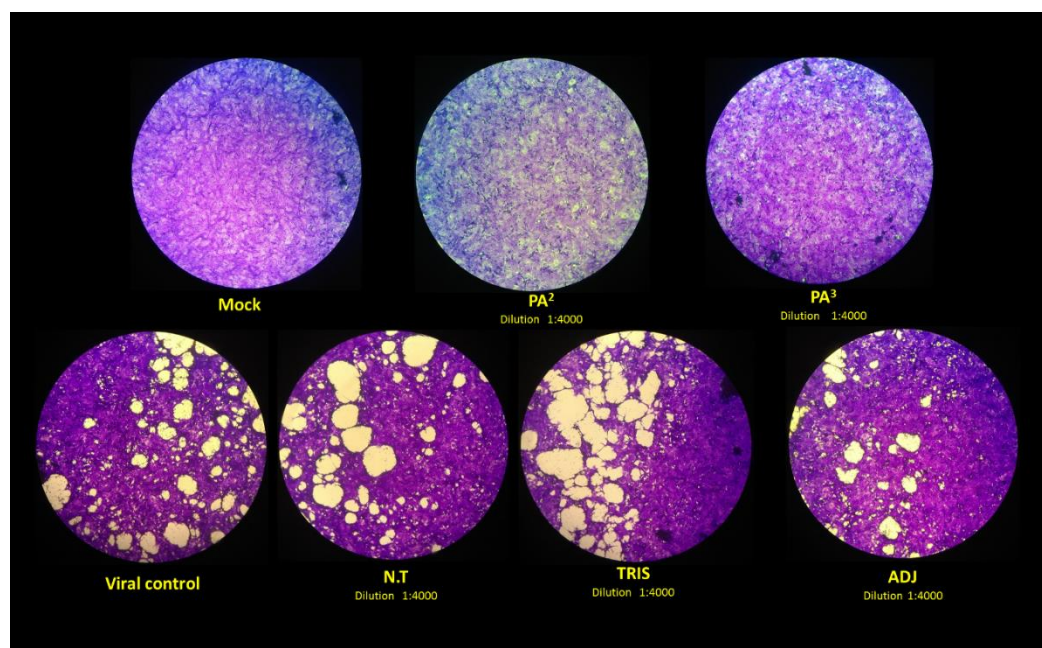
5.3.4. Capacidad neutralizante de los anticuerpos generados por la proteína P.A.

La proteína antigénica mostró ser inmunogénica, debido a que produjo anticuerpos de tipo IgG e IgA en los grupos de ratones inmunizados con la proteína P.A. El suero de los grupos experimentales (grupo PA²; PA³, Tris, Adyuvante y suero de preinmunización) fueron analizados a través de un ensayo de microneutralización contra el virus de la Influenza pdm A/H1N1.

Los grupos de Tris, Adyuvante y suero de preinmunización mostraron un título de 1:500 de neutralización, mientras que el grupo PA² mostró un título neutralizante de 3,600 y el grupo PA³ de 4,000. El análisis estadístico nos dice que tanto el grupo PA² y el grupo PA³ mostraron diferencias significativas con respecto a los grupos controles Tris, Adyuvante y el suero de preinmunización (N.T) (Fig. 18). En la Fig. 18b se muestra una monocapa saludable (Mock), así como una monocapa parcialmente destruida (control viral) con placas líticas producidas por el virus de la Influenza, también se puede observar el estado de las monocapas en la dilución del suero 1:4,000 y de todos los grupos experimentales. Es posible observar que la monocapa celular se mantiene intacta en cuando se coloca el suero de los ratones que fueron inmunizados con la proteína P.A., ya que tienen la capacidad de neutralizar el virus. Estos resultados nos indican que la proteína antigénica tiene una capacidad inmunoprotectora ante la presencia del virus de la Influenza A H1N1.



a)



b)

Figura 18. Determinación de la capacidad neutralizante de inmunoglobulinas de los sueros de los grupos experimentales. a) Títulos de anticuerpos neutralizantes contra influenza pdm A/H1N1, el suero de los grupos inmunizados con la proteína P.A con dos inmunizaciones (PA²), P.A con tres inmunizaciones (PA³), con el vehículo (TRIS), con el vehículo + Adyuvante (ADJ) y suero de los ratones no tratados (N.T). Se graficaron las media más la desviación estándar para cada grupo. Los grupos experimentales se analizaron mediante ANOVA una vía ($\alpha = 0.05$) con una test de comparación de medias de Tukey's (95% de confianza). Los grupos considerados estadísticamente diferentes se muestran con letras diferentes. b) Efecto citopático derivado de la replicación del virus de la Influenza en la línea celular MDCK. En el Mock se muestra la monocapa de sana, en el control viral se muestra de ruptura en la monocapa celular. También se muestra la capacidad de protección de la dilución 1:4,000 de los sueros de cada grupo experimental.

6. DISCUSIÓN

Actualmente en el mundo hay una gran expectación sobre las acciones en materia de salud pública, asociada a brote pandémico producido por SARS-CoV 2, el cual ha causado millones decesos e incalculables pérdidas económicas. Adicionalmente existe un riesgo latente del surgimiento de patógenos emergentes o reemergentes que compliquen la situación actual. El virus de influenza es el agente causal más frecuente de las enfermedades del sistema respiratorio. La ventaja evolutiva que tiene este virus son los mecanismos para la ganancia de diversidad genética (como reordenamiento, recombinación y errores de ARN polimerasa), lo que origina que puedan surgir nuevas cepas resistentes (Webby et al., 2013).

La alta tasa de mutación promueve la generación de cepas resistentes a los tratamientos (adamantinos e inhibidores de la neuraminidasa), lo que hace de vital importancia la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos. Estas situaciones enfatizan la importancia de generar nuevos medicamentos antivirales. En la sección 6.1 discutiremos la capacidad del péptido EB expresado en microalgas y su actividad antiviral.

Otra vertiente para combatir a la morbilidad y mortalidad causada por enfermedades infecciosas es a través de la vacunación. El objetivo de una inmunización controlada es el entrenamiento del sistema inmune para poder reconocer a un patógeno, desarrollar anticuerpo protectores y células del sistema inmune capaces de eliminar a células infectadas. Las vacunas para el virus de la influenza comenzaron a desarrollarse desde 1933 (Hannoun, 2013), con el paso de los años tanto el diseño, como la seguridad de la vacuna han mejorado, de tal manera que en la actualidad tenemos una gran diversidad. Sin embargo, la plataforma de producción continúa siendo por excelencia los huevos embrionados de pollo (Webby et al., 2013).

La vacunación es la estrategia profiláctica más importante para prevenir los efectos graves de una enfermedad infecciosa. El objetivo de una inmunización

controlada es poder entrenar al sistema inmune para que sea capaz de reconocer a un patógeno. La capacidad del virus de la influenza para adquirir variación genética conlleva a la necesidad de realizar actualizaciones anuales de las vacunas. Las vacunas actuales tienen como principal antígeno la hemaglutinina, que tienen la característica de ser inmunodominante e induce una alta producción de anticuerpos contra la región de cabeza de la HA (subunidad S1), la cabeza de la HA es la que más mutaciones acumula a través de la deriva y cambio antigénico. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevas vacunas mejoradas contra el virus de influenza que consideren una inmunidad más amplia y duradera contra las variantes (Krammer et al., 2018). Un nuevo enfoque, es la selección de antígenos más conservados de las proteínas virales, por ejemplo, el tallo proximal a la membrana de la HA (subunidad S2) el cual tiene la característica de ser conservado entre los subtipos de influencias, epítomos de la neuraminidasa (tallos), proteína de matriz 1 y la nucleoproteína N1 y el ectodominio de la proteína M2 (Krammer et al., 2018). Nuestros diseños de la proteína antigénica contemplan regiones conservadas. En la sección 6.2 y 6.3 discutiremos la expresión de P.A en un sistema de microalgas y bacteriano, respectivamente.

6.1. Rendimiento y actividad biológica del péptido EB producido en microalgas

Un punto crucial en proceso de infección viral, es la interacción de la hemaglutinina viral con el ácido siálico del receptor celular, el péptido EB ha mostrado bloquear esa interacción. La expresión de este péptido en *C. reinhardtii* tiene como objetivo disminuir los costos de producción en comparación con la síntesis orgánica. Adicionalmente se ha demostrado que la microalga no contiene elementos tóxicos para el consumo humano, por lo tanto, no es requerido un proceso estricto de purificación de proteínas recombinantes, por lo tanto, se ha estimado un ahorro del 80% en el proceso de producción (Chen, 2008; Rosales-Mendoza et al., 2020).

La producción de proteínas recombinantes en la microalga ha registrado un 0.02 a 2% de la proteína soluble total (PST) y rendimientos de 0.3 a 3 mg/L de medio

de cultivo en el caso de expresión en el cloroplasto (Rosales-Mendoza, 2013; Gimpel et al., 2015). También es posible expresar proteínas recombinantes haciendo inserciones en el genoma nuclear de la alga, sin embargo, es necesario considerar ciertos elementos potenciadores del rendimiento (Rasala et al., 2012). Por tal motivo, el gen del péptido EB fue optimizado en el uso de condones tanto para la expresión del genoma nuclear como para la expresión del genoma del cloroplasto de la microalga. El adecuado uso de codones en las microalgas evita la heterocromatización del DNA y el agotamiento de la transcripción (León y Galván, 2007).

Para mejorar la producción de la proteína recombinante producida en el núcleo de la microalga, se adicionó la secuencia señal de Pr1a, para promover la dirección de la síntesis de proteínas hacia la vía secretora. Adicionalmente, se le colocó una secuencia C-terminal KDEL que tiene como objetivo evitar la secreción de las proteínas, y dejarlas ancladas al retículo endoplásmico (Munro y Pelham, 1987; Sharma et al., 2000; Ziegler et al., 2000; Potvin y Zhang, 2010). Esta estrategia es importante porque mantiene a la proteína unida a la membrana interna del retículo endoplásmico disminuyendo la degradación citoplasmática, la cual es común en la microalga (Surzycki et al., 2009). Hempel y et al., 2011 y Hempel y Maier (2012) demostraron que en *Phaeodactylum tricornutum* se logró la acumulación de un anticuerpo anti-hepatitis B por el uso de una etiqueta de retención a retículo endoplásmico, evitando su translocación hacia el medio de cultivo.

La otra estrategia para tratar de lograr mayor rendimiento del péptido EB, fue la expresión en el sistema de cloroplasto. Muchos trabajos de expresión de proteínas recombinantes se han centrado en las ventajas que ofrece el cloroplasto, sobre todo los grandes rendimientos que se han obtenido (Rosales-Mendoza et al., 2020). Previamente Reyes-Barrera (2016), determinó que una línea transplastómica que contenía el gen del péptido EB producía 18 µg de EB por gramo de biomasa fresca, sin embargo, este dato se obtuvo de un extracto total (solubilizado con un agente caotrópico) de la microalga. Durante la presente, investigación se trató de

solubilizar al péptido EB en diferentes buffers, tenido solo éxito en buffer Tris. A pesar de ese logro, los extractos mostraron una concentración muy baja del péptido ($0.013\% \pm 0.01\%$ de EB en PST) y casi todo el péptido EB se obtuvo en la fracción insoluble y se tuvo que solubilizar con urea 8 M. Por tal razón decidimos no continuar los ensayos biológicos con el extracto de las microalgas transplastómicas.

Afortunadamente, los extractos en Tris de las microalgas transformadas en el núcleo con el gen que codifica al péptido EB, tienen un rendimiento del 4.99% de PST. Nosotros asociamos este rendimiento a que las proteínas endógenas tienen menor capacidad de disolverse en el agua MQ y la mayoría se queda en la fracción insoluble, este microambiente de extracción le confiere al péptido EB la ventaja de tener un mejor acceso al disolvente. En general, el péptido EB representa el 0.19% de la biomasa seca, estos valores son altos comparándolos con otros rendimientos de proteínas recombinantes producidas en microalgas. Por ejemplo, Barahimipour et al. (2016) expresaron por transformación nuclear, un antígeno del VIH (P24) bajo el promotor fusionado HSP70/RBCS₂ y el rendimiento fue del 0.25% de PST (Barahimipour et al., 2016). En otro trabajo que incluyó el uso de intrones RBCS₂, para aumentar la expresión del transgén, debido a que los intrones promueven estructuras secundarias de ARNm las cuales repercuten en un tiempo de vida media más largo en la microalga y mayor eficiencia de traducción, la expresión de eritropoyetina se logró con menor rendimiento que en nuestro trabajo, representando hasta 0.03% del peso seco (Eichler-Stahlberg et al., 2009).

El consumo de algas ha sido un elemento común en la dieta de los humanos y diversos mamíferos. Estudios recientes sobre alimentos nutraceuticos en humanos y en ratas no han mostrado citotoxicidad, al contrario, su consumo produce múltiples beneficios para la salud gastrointestinal (Tran et al., 2013; Endres y Murbach, 2018; Fields et al., 2020). En otro trabajo, Chávez et al. (2020) demostraron que los factores de crecimiento pro-angiogénicos humanos (hVEGF-165, hPDGF-B y hSDF-1) expresados en la *C. Reinhardtii*, estimularon los procesos de crecimiento sin mostrar efectos citotóxicos a las células de mamífero. Nosotros demostramos la inocuidad de los extractos que contenían EB y de las microalgas

sin transformar sobre las células MDCK, esto nos permitió utilizarlo con confianza en las pruebas biológicas para determinar que el péptido EB puede usarse como tratamiento profiláctico para prevenir la diseminación viral en el tracto respiratorio.

Previamente se había demostrado que el péptido EB es capaz de bloquear estequiométricamente los sitios de unión al ácido siálico (Downard et al., 2016), por lo que usamos un EB sintético como control y comparamos su efecto con el expresado en las microalgas y vimos que ambos interactúan con la hemaglutinina viral, impidiendo la unión con el sitio al ácido siálico de los eritrocitos humanos. Observamos que ambos péptidos tienen amplios rangos de protección y un efecto inhibitor dependiente de la dosis, como informa Jones et al. (2006). La eficacia del péptido EB expresado en microalgas es mayor que la del péptido sintético contra las cepas de influenza pandémica y de Virginia. Las concentraciones requeridas de EB para la inhibición son diferentes para cada cepa viral, este fenómeno fue informado por Jones y col. (2006), los cuales indican que la diferencia en los patrones de glicosilación de la HA puede estar implicada en la interacción con el sitio de unión al ácido siálico.

El péptido EB expresado en microalgas pudo inhibir la replicación viral con menos cantidad que el péptido sintético, a pesar de que ambos péptidos comparten la misma secuencia consenso funcional RRKKLAVLLALLAP, estos aminoácidos son los encargados de interactuar con el sitio de unión de la HA (Bultmann et al., 2010; Jones et al., 2011). Las diferencias entre ambos péptidos derivan que el expresado en algas tiene 10 aminoácidos más que el sintético (sitio de enteroquinasa y seis histidinas) lo que puede proporcionar más estabilidad que el péptido EB solo. Otra razón es que el péptido EB sintético es altamente hidrofóbico al auto-aglomerarse (Bultmann et al., 2010), lo que compromete su biodisponibilidad.

Adicionalmente, el microambiente de los componentes endógenos contenido en el extracto soluble que contiene el péptido EB, le confiere protección adicional

contra la degradación mediada por la tripsina (incorporada al medio para asegurar la infectividad del virus), por esa razón el extracto de microalga que contiene EB tiene un tiempo de vida útil más prolongado en comparación con el péptido sintético. Dicho efecto protector contra la degradación proteolítica mediada en las mucosas ha sido reportado previamente para proteínas recombinantes expresadas en *C. reinhardtii* (Ochoa-Méndez et al., 2016; Carrizales-López et al., 2018). Además, se ha demostrado que los extractos de microalgas contienen componentes que mejoran la actividad biológica, propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras (Rosales-Mendoza, 2013; Rosales-Mendoza et al., 2020).

C. reinhardtii ha demostrado ser una buena plataforma de expresión de biofármacos. Demostramos que el péptido EB se expresa en niveles elevados en microalgas transformadas y se puede extraer como parte de la fracción de la proteína soluble total. Sugerimos que las modificaciones postraduccionales conferidas a las microalgas al péptido EB y los aminoácidos adicionales aumentaron la eficiencia frente al péptido EB sintético.

6.2. Producción de una proteína antigénica vs influenza expresada en microalgas

El uso de la microalga como plataforma para expresión de proteínas recombinantes ha tenido un buen desempeño por su accesibilidad a la transformación genética, tanto al del genoma nuclear como al del cloroplasto; y a las ventajas que ofrece cada vía, desde la perspectiva transcripcional, traduccional y postraducciona

Hasta el momento existen diversas técnicas para la introducción de genes foráneos en el genoma nuclear de la microalga, como lo son: biobalística, agitación con perlas de vidrio, electroporación y transferencia mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Uno de los métodos que ha mostrado buena eficiencia de transformación es la transferencia de ADN mediada por *A. tumefaciens*, la cual es una bacteria Gram negativa que tiene la propiedad de transferir el plásmido Ti al

genoma de la planta. Este proceso natural de transferencia se puede implementar para introducir genes de interés al núcleo celular al estimularlo exógenamente con acetosiringona. Kumar et al. (2004) reportaron una práctica metodología para transformar a *C. reinhardtii* en su genoma nuclear utilizando *A. tumefaciens*. En nuestro trabajo implementamos esta metodología que nos permitió obtener dos líneas transgénicas, este resultado fue producto de la transferencia mediada por la acetosiringona. El análisis de detección del transgén por PCR a las dos líneas resistentes a higromicina, nos indican la integración al genoma, y por otro lado vimos que no afecta el crecimiento o a la viabilidad de las microalgas. Adicionalmente la capacidad de crecimiento por más de 4,000 generaciones en medio selectivo nos demuestra que es una integración estable (Kumar et al., 2004).

La expresión de proteínas terapéuticas en el cloroplasto de la microalga tiene una gran importancia biotecnológica por las ventajas que ofrece, ya que cuenta con su propio genoma circular, posee una maquinaria traduccional y transcripcional autónoma, cuenta con chaperonas y disulfuro isomerasas que pueden realizar puentes disulfuro para la creación de proteínas complejas (Levitan et al., 2005; Rosales-Mendoza et al., 2020; Schellekens, 2004; Tran et al., 2013). Por estos motivos transformamos el genoma del cloroplasto de la microalga utilizando biobalística. A través de PCR se detectó el transgén de la proteína P.A en las líneas resistentes a espectinomicina.

El análisis de la expresión de la proteína P.A en las microalgas transformadas, nos indican que se está produciendo la proteína recombinante. De las dos líneas analizadas hay una señal más intensa en la línea N1, mientras que en la línea N2 la señal casi es indetectable. La señal de la proteína P.A en la línea N1 es similar a la del control positivo (1mg de P.A expresado y purificado en bacteria). Se ha demostrado que la transformación nuclear puede presentar una expresión diferencial asociada al efecto del posicionamiento del transgén (ya que existen regiones en el genoma que tienen más actividad transcripcional). En ocasiones ese posicionamiento puede desencadenar un proceso de silenciamiento génico asociado a eventos epigenéticos intrínsecos en la microalga (Doron et al., 2006).

Particularmente, la transformación mediada por *A. tumefaciens* inserta el transgén por recombinación ilegítima, por lo tanto, el nivel de expresión del transgén va a estar influenciado por que tanta actividad transcripcional tenga el sitio donde se encuentre (Doron et al., 2006; León y Fernández, 2007). Por tal motivo es esencial determinar cuál de las líneas transgénicas tienen una alta expresión de la proteína P. A.

El vector utilizado en la transformación fue p463, el cual contienen una región de 3 kb homóloga a la región tsaA (región trans-splicing requerida para la unión del exón 1 y 2 del gen psaA) del cloroplasto de *C. reinhardtii*. Esta región asegura una integración de tipo unilateral de todo el plásmido, y el evento ocurre por recombinación homóloga (Reyes-Barrera, 2016; Rosales-Mendoza, 2016). Para el garantizar la transformación, se efectúan rondas consecutivas en medio de selección, lo cual permite eliminar aquellos genomas no transformados, hasta el punto en donde todas las copias del genoma del cloroplasto se encuentren transformados (aproximadamente ochenta copias del genoma), promoviendo al estado de homoplastía (Rosales-Mendoza, 2016). Nuestras líneas transplastómicas que contienen el gen de la proteína P.A son homoplásticas y corroboramos que el método de transformación utilizado es eficiente y tiene la ventaja de generar líneas transplastómicas estables en poco tiempo, como lo han demostrado otras investigaciones en esta especie de microalga (Mayfield y Kindle, 1990; Mayfield et al., 2007).

A través de la inmunodetección con el anticuerpo anti-P.A, se visualizó a la proteína P.A en los extractos totales de las microalgas transplastómicas, dicha proteína tiene el mismo tamaño que la proteína P.A expresada y purificada de *E. coli*. Esto demuestra que la microalga tiene la capacidad de producir y acumular a la proteína P.A en el cloroplasto. Particularmente la línea transplastómica C2 muestra una señal más intensa en comparación con la línea C1. Estas diferencias en la expresión pueden estar vinculadas con el efecto del transformosoma, el cual refiere que el proceso de transformación de cada línea transplastómica generada

desarrolla características únicas que van a determinar la capacidad de expresar proteínas recombinantes (Surzycki et al., 2009; Rosales-Mendoza; 2016).

En conclusión, la microalga *C. reinhardtii* tiene la capacidad de expresar la proteína P.A mediante transformación nuclear y de cloroplasto, por lo que es una plataforma para expresar un prototipo de vacuna que contiene múltiples epítomos de las proteínas estructurales del virus de la influenza A H1N1. Debido a que las microalgas transformadas pueden producirse en grandes volúmenes, es posible producir en gran escala a las microalgas y liofilizarlas con el objetivo de posteriormente probar la capacidad de ser utilizada como una vacuna que pueda ser administrada por vía oral.

6.3. Proteína antigénica expresada en *E. coli* y su respuesta inmune en ratones

El diseño de la proteína P.A es de una vacuna multiépitopo en donde cada uno de éstos se encuentra unido por un espaciador de prolina y glicinas para una exposición lineal de los epítomos (Livingston et al., 2002). Este diseño (secuencia de aminoácidos) no demostró *in silico* (utilizando AllerTop) la presencia de elementos que desencadenaran alguna reacción alérgica.

La expresión de la proteína P.A fue realizada en *E. coli* BL21, el alto nivel de expresión propició la generación de cuerpos de inclusión, los que posteriormente se aislaron. La proteína P.A se purificó de los cuerpos de inclusión y se renaturalizó en la columna de afinidad a níquel. En general, la P.A presentó buena estabilidad en el Buffer TBS (Tris Buffer Salino) a 4 °C sin mostrar degradación. Esta característica es importante porque no es necesario una cadena de conservación en ultracongelamiento (-20 °C o -70 °C).

La inmunización vía subcutánea/intraperitoneal de la proteína antigénica en ratonas BALB/c tiene la capacidad de producir anticuerpos IgG. La proteína P.A es

capaz de inducir al sistema inmune humoral, ya que promueve un alto título de anticuerpos cuando se administra, por lo tanto, se puede decir que la proteína está funcionando como un antígeno eficaz o inmunogénico (Ritter, 2000). Adicionalmente los epítomos elegidos bioinformáticamente (para la presentación al MHC de clase I y II) nos demostraron en el experimento *in vivo* que son capaces de generar una respuesta inflamatoria local. Las células presentadoras de antígenos (células dendríticas y macrófagos de tejido epitelial o peritoneales) fagocitan a P.A y cargan los epítomos al MHC, de tal manera que son capaces de estimular y entrenar a los linfocitos B, para la producción anticuerpos.

Los subtipos de inmunoglobulinas nos permiten conocer la contribución relativa de las citosinas que inmunomodulan las repuesta Th1 y Th2 (Cribbs et al., 2003). En cuanto al balance de la respuesta Th1/Th2, nuestra vacuna (con epítomos relevantes de influenza) es capaz de inducir una respuesta mayoritariamente de tipo Th2 en ratones, debido a que se producen mayormente las inmunoglobulinas IgG1 en comparación con las de tipo IgG2a en los grupos de ratones inmunizados con la proteína P.A. Las funciones efectoras del Fc (región del anticuerpo que interactúa con la superficie de los receptores celulares) de los anticuerpos IgG1 tienen una interacción de baja afinidad a los receptores Fc celulares: sin embargo, han demostrado capacidad protectora contra el virus (Kodihalli et al., 1997; 1999; Huber et al., 2006). Rosendahl et al., (2015) probaron péptidos sintéticos que contienen epítomos conservados tanto para células B y T, en ratones BALB/c y observaron que la vacuna tiene una respuesta inclinada hacia Th2, porque se produjeron una alta cantidad de IgG1. Adicionalmente los grupos inmunizados con la proteína P.A producen anticuerpos IgG2a, los cuales tienen afinidad a los receptores activadores Fc y pueden activar a la vía de eliminación de patógenos mediados por el complemento y la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (Neuberger y Rajewsky, 1981; Huber et al., 2006; Shibuya et al., 2020).

La proteína P.A es capaz de producir anticuerpos IgA en suero de los ratones cuando se realiza una tercera inmunización. La IgA es un anticuerpo que participa en la inmunidad de mucosas, principalmente en el tracto respiratorio, y su función

principal es la de bloquear la entrada del virus a las células del epitelio traqueopulmonar. La detección de IgA en el suero nos confirma que hay producción de IgA secretora ya que es una inmunoglobulina de fácil transporte en la mucosa (Ito et al., 2003).

La proteína P.A no produce anticuerpo IgE, el cual es un marcador de un estado de sensibilización alérgica (Hamilton et al., 2020). De manera particular, la ausencia de este tipo de anticuerpo en el suero de los ratones inmunizados nos permite determinar que nuestra vacuna no contiene algún epítipo o elementos en su secuencia de aminoácidos clasificado como alergénico.

La capacidad inmunoprotectora se determinó por el ensayo de microneutralización viral, midiendo la capacidad de los anticuerpos de inhibir la infección de las células y con ello evitar el efecto citopático causado por la replicación del virus de la influenza (Kawaoka, 2018). Los anticuerpos generados después de la segunda y tercera inmunización de P.A son capaces de neutralizar la entrada y por consecuencia la replicación del virus de la influenza, por lo tanto los anticuerpos son funcionales e inmunoprotectores. Adicionalmente se ha demostrado que cuando se generan anticuerpos contra el tallo de la HA, NA y el ectodominio de M2, estos pueden unirse a sus dianas, inhibiendo directamente al virus (Krammer et al., 2018, Voutssas-Lara et al., 2021).

En general, nuestra vacuna con epítipos conservados de virus de la influenza demostró ser inmunogénica, inducir inmunidad humoral, así como ser inmunoprotectora, lo cual concuerda con lo publicado con Atsmont et al., (2014) que menciona que lo más importante es la elección de los epítipos antigénicos que formarán parte de la proteína que se utilizará como vacuna y que estos epítipos se presenten de manera lineal, para conferir protección contra la infección del virus de la Influenza.

En futuro se seguirán requiriendo vacunas actualizadas contra nuevas variantes del virus de la influenza; dichas vacunas deben generar respuestas tanto

celulares como humorales, ser eficaces y seguras. El reto vigente es la exploración de nuevas plataformas de producción de rápida expresión para la obtención de vacunas universales en corto tiempo.

7. CONCLUSIONES

Es posible producir al péptido EB vía transformación nuclear de microalgas y extraerlo en forma soluble en amortiguadores Tris y agua milliQ. Los extractos de alga que contienen al péptido EB así como el péptido EB sintético, son inocuos para la monocapa de células MDCK. El péptido EB expresado en algas, así como el sintético, tienen la capacidad de inhibir la unión de la hemaglutinina a su receptor en la membrana celular. En el ensayo biológico de la inhibición de la replicación viral, el péptido EB es capaz de depletar la replicación del virus de la Influenza pdm A/H1N1 por lo tanto, puede ser utilizado como profiláctico. Por último, es claro que el péptido EB expresado en alga es más efectivo que el péptido sintético para inhibir la entrada del virus a la célula, por lo tanto el uso de microalga *Chlamydomonas reinhardtii* es una buena plataforma para la producción de péptidos antivirales que eviten la propagación viral.

Es posible transformar las microalgas con el gen que codifica a la proteína antigénica P.A utilizando *A. tumefaciens* para la transformación nuclear y se puede detectar a proteína P.A por Western Blot. En lo que respecta a la transformación de cloroplastos por biobalística, es posible obtener varias líneas transplastómicas homoplásticas que expresan la proteína P.A.

Es viable expresar y purificar la proteína P.A en *E. coli* BL21. Esta proteína es capaz de producir anticuerpos específicos y de alta afinidad a su antígeno. La proteína P.A con epítomos relevantes de Influenza es capaz de inducir una

respuesta humoral de tipo Th2, además genera altos títulos de IgG1, IgG2a e IgA y no producen anticuerpos IgE. Los anticuerpos mostraron inmunoprotección debido a que pueden neutralizar la entrada del virus de la Influenza A pdm A/H1N1. Por lo tanto, la proteína P.A se puede utilizar como vacuna ya que tiene propiedades inmunogénicas e inmunoprotectoras contra el virus de influenza.

8. ANEXOS

Durante la realización de la presente investigación doctoral se logró la publicación de los siguientes artículos:

Reyes-Barrera, K. L., Soria-Guerra, R. E., López-Martínez, R., Huerta, L., Salinas-Jazmín, N., Cabello-Gutiérrez, C., & Alpuche-Solís, Á. G. (2021). The Entry Blocker Peptide Produced in *Chlamydomonas reinhardtii* Inhibits Influenza Viral Replication *in vitro*. *Front Plant Sci.* 12, 641420. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.641420>

Voutssas-Lara, J., Cervantes-Torres, J., Hernández, M., Bobes, R. J., Lamoyi, E., Vázquez-Ramírez, R., et al. (2021). Influence of adjuvants on the amount, specificity and functional activity of antibody response to human influenza vaccine in mice. *Molecular immunology*. 135. 398–407. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.05.003>.

Sanchez-Alvarez, K., Rosales-Mendoza, S., Reyes-Barrera, K.L. et al. (2021). Antibodies induced by oral immunization of mice with a recombinant protein produced in tobacco plants harboring Bordetella pertussis epitopes. *PCTOC*. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02107-1>

9. REFERENCIAS

- Akkarawongsa, R., Cullinan, A.E., Zinkel, A., Clarin, J. y Brandt, C.R. (2006). Corneal toxicity of cell-penetrating peptides that inhibit Herpes simplex virus entry. *J Ocul Pharmacol Ther.* 22. 279-289. doi: 10.1089 / jop.2006.22.279.
- Altmann, S. E., Brandt, C. R., Jahrling, P. B. y Blaney, J. E., (2012). Antiviral activity of the EB peptide against zoonotic poxviruses. *Viol J.* 9:6. doi: tps://doi.org/10.1186/1743-422X-9-6.
- Altmann, S., E, Jones, J., C., Schultz-Cherry, S. y Brandt, C., R. (2009). Inhibition of Vaccinia virus entry by a broad spectrum antiviral peptide. *Viol.* 388. 248-259. doi: 10.1016 / j.viol.2009.03.023
- Atsmon, J., Caraco, Y., Ziv-Sefer, S, Shaikevich, D., Abramov, E., Volokhov, I., Haima, K, Y, Gottlieb, T. y Ben-Yedidia, T. (2014). Priming by a novel universal influenza vaccine (Multimeric-001)-a gateway for improving immune response in the elderly population. *Vaccine.* 7: 32. 5816-5823. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.08.031.
- Atsmon, J., Kate-Ilovitz, E., Shaikevich, D., Singer, Y., Volokhov, I., Haim, K., Y. y Ben-Yedidia, T. (2012). Safety and immunogenicity of multimeric-001--a novel universal influenza vaccine. *J Clin Immunol.* 32. 595-603.
- Balish, A.L., Katz, J.M., Klimov, al. 2013. Influenza propagation, quantification and storage. *Curr Protoc Microbiol* Chapter 15 Unit 15 G1.
- Barahimipour, R., Neupert, J., y Bock, R. (2016). Efficient expression of nuclear transgenes in the green alga *Chlamydomonas*: synthesis of an HIV antigen and development of a new selectable marker. *Plant Mol Biol.* 90. 403–418. doi: 10.1007/s11103-015-0425-8
- Bultmann, H., Girdaukas, G., Kwon, G. S., y Brandt, C. R. (2010). The virucidal EB peptide protects host cells from herpes simplex virus type 1 infection in the presence of serum albumin and aggregates proteins in a detergent-like manner. *Antimicrob Agents Chemother.* 54, 4275–4289. doi: 10.1128/AAC.00495-10
- Carrizales-López, C., González-Ortega, O., Ochoa-Méndez, C. E., Galván-Moreno, F. U., Rosales-Mendoza, S., Monreal-Escalante, E., et al. (2018). Expression of multiple antihypertensive peptides as a fusion protein in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Appl Phycol.* 30. 1701–1709. doi: 10.1007/s10811-017-1339-4
- CDC (2021). Past Pandemics. Disponible online: <https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/basics/past-pandemics.html> (Consultado el 19 Enero 2021).
- Chávez, M. N., Centeno-Cerdas, C., Bohne, A., Hopfner, U., Machens, H., Egaña, J. T., et al. (2020). Towards a biotechnological platform for the production of human pro-

- angiogenic growth factors in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 104. 725–739. doi: 10.1007/s00253-019-10267-6
- Chen, Q. (2008). Expression and purification of pharmaceutical proteins in plants. *Biol Eng Trans*. 1, 291–321. doi: 10.13031/2013.26854
 - Condit, R. (2013). Principles of virology. In: Fields Virology, Knipe DM, Howley PM, Cohen JI, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Racaniello VR, Roizman B (eds). (Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins), doi:10.1136/vr.i1135.
 - Costa, S., Almeida, A., Castro, A. y Domínguez, L., (2014). Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Front Microbiol*. 5:63.
 - Cox, R.M., Wolf, J.D. y Plemper, R.K. (2021). Therapeutically administered ribonucleoside analogue MK-4482/EIDD-2801 blocks SARS-CoV-2 transmission in ferrets. *Nat Microbiol*. 6. 11–18. doi: <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00835-2>
 - Cribbs, D. H., Ghochikyan, A., Vasilevko, V, Tran, M., Petrushina. I., Sadzikava, N., et al., (2003). Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with beta-amyloid. *Int Immunol* 15:4. 505-514
 - Demurtas, O.C., Massa, S. y Ferrante. P. (2013). A *Chlamydomonas* - derived Human Papillomavirus 16 E7 vaccine induces specific tumor protection. *PLoS One*. 2013; 8:4. e61473.
 - Doron, L., Segal, N. y Shapira, M. (2016). Transgene expression in microalgae—From tools to applications. *Front Plant Sci* . 7. 505. doi: 10.3389/fpls.2016.00505
 - Downard, K. M., Lu, R., y Mu, P. (2016). Molecular basis of influenza hemagglutinin inhibition with an entry-blocker peptide by computational docking and mass spectrometry. *Antivir Chem Chemother*. 24. 109–117. doi: 10.1177/2040206615622920
 - Eichler-Stahlberg, A., Weisheit, W., Ruecker, O., y Heitze, M. (2009). Strategies to facilitate transgene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 229. 873–883. doi: 10.1007/s00425-008-0879-x
 - Eisfeld, A. J., Neumann, G., y Kawaoka, Y. (2014). Influenza a virus isolation, culture and identification. *Nat. Protoc*. 9, 2663–2681. doi: 10.1038/nprot.2014.180
 - Endres, J. R., y Murbach, T. S. (2018). A toxicological evaluation of *Chlamydomonas reinhardtii*, a green algae. *Int J Toxicol*. 37. 53–62. doi: 10.1177/1091581817746109
 - FDA (2020). Influenza virus vaccine composition and lot release. Disponible en <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/lot-release/influenza-virus-vaccine-composition-and-lot-release>

- FDA (2021). Vaccines Licensed for Use in the United States. Disponible en <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/vaccines-licensed-use-united-states>
- Fields, F. J., Lejzerowicz, F., Schroeder, D., Ngoi, S. M., Tran, M., McDonald, D., et al. (2020). Effects of the microalgae *Chlamydomonas* on gastrointestinal health. *J Funct Foods* 65.103738. doi: 10.1016/j.jff.2019.103738
- Fujita, J. (2021) Influenza. Advances in Diagnosis and Management. Singapore, Springer. doi: <https://biblos.ipicyt.edu.mx:2116/10.1007/978-981-15-9109-9>
- Furuta, Y., Takahashi, K., Kuno-Maekawa, M., Sangawa H., Uehara, S., Kozaki, K., et al. (2005). Mechanism of action of T-705 against influenza virus. *Antimicrob Agents Chemother.* 49. 981-986.
- Garten, R.J., Davis, C.T., Russell, C.A., Shu, B., Lindstrom, S., Balish, A., et al. (2009). Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science.* 325:197-201. doi: 10.1126/science.1176225.
- GenScript (2018) THE TM His Tag Antibody, mAb, Mouse. https://www.genscript.com/antibody/A00186-THE_sup_TM_sup_His_Tag_Antibody_mAb_Mouse.html accedido el 26/05/2020
- Gianfrani C, Oseroff C, Sidney J, Chesnut RW, Sette A (2000) Human memory CTL response specific for influenza A virus is broad and multispecific. *Hum Immunol.* 61.438-452
- Gimpel, J. A., Hyun, J. S., Schoepp, N. G., y Mayfield, S. P. (2015). Production of recombinant proteins in microalgae at pilot greenhouse scale. *Biotechnol Bioeng.* 112. 339–345. doi: 10.1002/bit.25357
- Greenfield, E. A. (2014) Antibodies: A Laboratory Manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Gregory, J. A., Shepley-McTaggart, A., Umpierrez, M., Hurlburt, B., Maleki, S., Sampson, H., Mayfield S. y Berin C. (2016). Immunotherapy using algal-produced Ara h 1 core domain suppresses peanut allergy in mice. *Plant Biotechnol J.* 14:7.1541-50.
- Hamilton, R. G., Hemmer, W., Nopp, A., y Kleine-Tebbe, J. (2020). Advances in IgE testing for diagnosis of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 8:8. 2495–2504.
- Hannoun, C., (2013). The evolving history of influenza viruses and influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 12:9. 1085-1094. doi: 10.1586/14760584.2013.824709
- Hempel, F. y Maier, U. G. (2012). An engineered diatom acting like a plasma cell secreting human IgG antibodies with high efficiency. *Microb Cell Factories.* 11:126. doi: 10.1186/1475-2859-11-126.

- Hempel, F., Lau, J., Klingl, A., y Maier, U. G. (2011). Algae as protein factories: expression of a human antibody and the respective antigen in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PLoS One* 6. e28424. doi: 10.1371/journal.pone.0028424
- Huber, V. C., McKeon, R. M., Brackin, M. N., Miller, L. A., Keating, R., Brown, S. A., et al., (2006). Distinct contributions of vaccine-induced immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2a antibodies to protective immunity against influenza. *Clin Vaccine Immunol.* CVI, 13:9. 981–990. <https://doi.org/10.1128/CVI.00156-06>
- Ito R, Ozaki YA, Yoshikawa T, Hasegawa H, Sato Y, Suzuki Y, et al., (2003). Roles of anti-hemagglutinin IgA and IgG antibodies in different sites of the respiratory tract of vaccinated mice in preventing lethal influenza pneumonia. *Vaccine*.21. 2362-2371. doi: 10.1016/s0264-410x(03)00078-1.
- Iuliano, A. D, Roguski, K. M, Chang, H. H., Muscatello, D. J., Palekar, R., Tempia, S., et al. (2018). Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet*. 391. 1285–1300. doi:10.1016/S0140-6736(17)33293-2.
- Jones, J. C., Turpin, E. A., Bultmann, H. Brandt, C. R. y Schultz-Cherry, S. (2006). Inhibition of influenza virus infection by a novel antiviral peptide that targets viral attachment to cells. *J Virol*. 80. 11960–11967. doi:10.1128/JVI.01678-06.
- Jones, J. C., Settles, E. W., Brandt, C. R., y Schultz-Cherry, S. (2011). Identification of the minimal active sequence of an anti-influenza virus peptide. *Antimicrob Agents Chemother*. 55. 1810–1813. doi: 10.1128/AAC.01428-10.
- Kawaoka Y, (2018) Influenza Virus: Methods and protocols. Humana Press (Methods on Molecular Biology Vol 1836).
- Kawaoka, Y., y Neumann, G. (2012). Influenza Virus. Methods and Protocols. New York: Humana Press. 1-50.
- Kodihalli, S., Haynes, J. R., Robinson, H. L., y Webster, R. G. (1997). Cross-protection among lethal H5N2 influenza viruses induced by DNA vaccine to the hemagglutinin. *J Virol*. 71:5. 3391–3396.
- Kodihalli, S., Goto, H., Kobasa, D. L., Krauss, S., Kawaoka, Y., y Webster, R. G. (1999). DNA vaccine encoding hemagglutinin provides protective immunity against H5N1 influenza virus infection in mice. *J Virol*. 73:3. 2094–2098.
- Krammer, F., García-Sastre. A., y Palese, P. (2018). Is It Possible to Develop a “Universal” Influenza Virus Vaccine?. Toward a Universal Influenza Virus Vaccine: Potential Target Antigens and Critical Aspects for Vaccine Development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 10:7. a028845. doi: 10.1101/cshperspect.a028845.

- Kumar, S. V., Misquitta, R. W., Reddy, V. S., Rao, B. J., y Rajam, M. V. (2004). Genetic transformation of the green alga -*Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci.* 166, 731–738. doi: 10.1016/j.plantsci.2003.11.012.
- L’Huillier, A. G., Abed, Y., Petty, T. J., Cordey, S., Thomas, Y., Bouhy, X., et al. (2015). E119D neuraminidase mutation conferring pan-resistance to neuraminidase inhibitors in an A(H1N1) pdm09 isolate from a stem-cell transplant recipient. *J Infect Dis.* 212. 1726-1734. doi:10.1093/infdis/jiv288.
- LeBlanc, Z., Waterhouse, P. y Bally, J. (2021). Plant-based vaccines: The way ahead?. *Viruses.* 13:5. doi: <https://doi.org/10.3390/v13010005>
- León, R. y Fernández, E. (2007). Nuclear transformation of eukaryotic microalgae: historical overview, achievements and problems. *Adv Exp Med Biol.* 616. 1–11. doi: 10.1007/978-0-387-75532-8_1.
- León, R. y Galván, A. F. E. (Eds.) (2007). Transgenic Microalgae as Green Cell Factories. *Adv. Exp. Med. Biol.* New York, NY: Springer.
- Levitan. A., Trebitsh. T., Kiss, V., Pereg, Y., Dangoor, I. y Danon, A. (2005). Dual targeting of the protein disulfide isomerase RB60 to the chloroplast and the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci.* 102: 17. 6225-6230. doi: 10.1073/pnas.0500676102.
- Li, W., Escarpe, P.A., Eisenberg, E.J., Cundy, K.C., Sweet, C., Jakeman, K.J., et al., (1998). Identification of GS 4104 as an orally bioavailable prodrug of the influenza virus neuraminidase inhibitor GS 4071. *Antimicrob Agents Chemother.* 42. 647-653.
- Livingston, B., Crimi, C., Newman, M., Higashimoto, Y., Appella, E., Sidney, J., Sette, A. (2002). A rational strategy to design multiepitope immunogens based on multiple Th lymphocyte epitopes. *J Immunol.* 168: 5499–5506.
- Mayfield, S. P. y Kindle, K. L. (1990). Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by using a *C. reinhardtii* gene as the selectable marker. *Proc Natl Acad Sci.* 87. 2087-2091.
- Mayfield, S.P., Franklin, S.E. y Lerner, R. A. (2003). Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proc Natl Acad Sci.* 100. 438-442.
- Mayfield, S.P., Manuell, A. L., Chen, S., Wu, J., Tran, M., Siefker, D., Muto, M. y Marin-Navarro, J. (2007). *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories. *Curr Opin Biotech.* 18. 126-133.
- Munro, S. y Pelham, H. R. B. (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48, 899–907. doi: 10.1016/0092-8674(87)90086-9
- Neuberger, M. S. y Rajewsky, K. (1981). Activation of mouse complement by monoclonal mouse antibodies. *Eur J Immunol.* 11. 1012-1016.

- Newman, S. M., Boynton, J. E., Gillham, N. W., Randolph-Anderson, B. L., Johnson, A. M. & Harris E.H. (1990). Transformation of chloroplast ribosomal RNA genes in *Chlamydomonas*: molecular and genetic characterization of integration events. *Genetics*. 126: 4. 875–888. doi: <https://doi.org/10.1093/genetics/126.4.875>
- Ochoa-Méndez, C., Lara-Hernández, I., Martínez-González, L., Aguirre-Bañuelos, P., Ibarra-Barajas, M., Castro-Moreno, P., González-Ortega, O. y Soria-Guerra, R. E. (2016). Bioactivity of an antihypertensive peptide expressed in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biotechnol*. 240. 76-84. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.11.001>
- PAHO, (2019). Cuáles son las 10 principales amenazas a la salud en el 2019. Disponible online: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14916:ten-threats-to-global-health-in-2019&Itemid=135&lang=es. (Consultado 19 de enero del 2021).
- Pawelec, G., y McElhaney, J. (2020). Recent advances in influenza vaccines. *F1000 Research*, 9, F1000 Faculty Rev 9: 305, 1-7. doi: <https://doi.org/10.12688/f1000research.22611.1>
- Pogge von Strandmann, E., Zoidl, C., Nakhei, H., Holewe, B., Pogge von Strandmann, R., et al., (1995) A highly specific and sensitive monoclonal antibody detecting histidine-tagged recombinant proteins. *Protein Eng*. 8: 733-735.
- Potvin, G. y Zhang, Z. (2010). Strategies for high-level recombinant protein expression in transgenic microalgae: a review. *Biotechnol Adv*. 28. 910–918. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.08.006.
- Racaniello V. (2009). Structure of influenza virus. Disponible online: <https://www.virology.ws/2009/04/30/structure-of-influenza-virus/> (Consultado el 19 de enero de 2021).
- Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N. P., Bachor, O. A. y Stevanovic, S. (1999) SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*. 50. 213-219
- Rasala, B. A., Lee, P. A., Shen, Z., Briggs, S. P., Mendez, M., y Mayfield, S. P. (2012). Robust expression and secretion of xylanase1 in *Chlamydomonas reinhardtii* by fusion to a selection gene and processing with the FMDV 2A peptide. *PLoS One*. 7. e43349. doi: 10.1371/journal.pone.0043349.
- Reyes-Barrera, K. L. (2016). Producción de péptidos contra influenza A H1N1 en *Chlamydomonas reinhardtii*. Tesis de Maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C.
- Richt, J.A., y Webby, R.J. (2013). Swine influenza. *Curr Top Microbiol Immunol*. Vol 370. New York: Springer. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-36871-4>.
- Rinas, U., Garcia-Fruitos, E., Corchero, J. L., Vazquez, E., Seras-Franzoso, J., Villaverde, A. (2017). Bacterial inclusion bodies: discovering their better half. *Trends Biochem Sci*. 42:9. 726-737.

- Ritter, M. A., (2000). Polyclonal and monoclonal antibodies. In Diagnostic and Therapeutic Antibodies. Humana Press.
- Rochaix, J., D. (1995). *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. *Annu Rev Genet.* 29. 209-230.
- Rockman, S., Laurie, K L., Parkes, S., Wheatley, A. y Barr, I G. (2020). New Technologies for Influenza Vaccines. *Microorganisms.* 8:11. 1745. doi: 10.3390/microorganisms8111745.
- Rodríguez-Carmona, E., Cano-Garrido, O., Seras-Franzoso, J., Villaverde, A. y García-Fruitós, E., (2010). Isolation of cell-free bacterial inclusion bodies. *Microb Cell Fact.* 9:71. doi: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-71>.
- Rosales-Mendoza, S. (2016). Algae-Based Biopharmaceuticals. Switzerland. Springer, 172 pp.
- Rosales-Mendoza, S. (2013). Future directions for the development of *Chlamydomonas* - based vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 12. 1011–1019. doi: 10.1586/14760584.2013.825455
- Rosales-Mendoza, S., Solís-Andrade, K., Márquez-Escobar, V., González-Ortega, O. y Bañuelos-Hernández B. (2020): Current advances in the algae-made biopharmaceuticals field. *Expert Opin Biol Ther.* 20:7. 751-766. doi:10.1080/14712598.2020.1739643.
- Rosendahl Huber, S.K., Camps, M. G., Jacobi, R. H., Mouthaan, J., van Dijken, H., van Beek, J., et al., (2015). Synthetic long peptide influenza vaccine containing conserved T and B cell epitopes deduces viral load in lungs of mice and ferrets. *PLoS One.* 10:6. e0127969.
- Sanjuan, R., Nebot, M., R., Chirico, N., Mansky, L. M., y Belshaw, R. (2010). Viral mutation rates. *J Virol.* 84:19. 9733-9748. doi: 10.1128/JVI.00694-10.
- Schagger, H., (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc.* 1. 16-22.
- Schellekens, H. (2004). How similar ‘biosimilars’ need to be?. *Nat Biotechnol.* 22:11. 1357–1359.
- Sharma, A., Sharma, R., Imamura, M., y Yamakawa, M. Y. H. M. (2000). Transgenic expression of cecropin B, an antibacterial peptide from *Bombyx mori*, confers enhanced resistance to bacterial leaf blight in rice. *FEBS Lett.* 484. 7–11. doi: 10.1016/S0014-5793(00)02106-2.
- Shibuya, M., Aoshi, T., Kuroda, E., & Yoshioka, Y. (2020). Murine cross-reactive nonneutralizing polyclonal IgG1 antibodies induced by influenza vaccine inhibit the cross-protective effect of IgG2 against heterologous virus in mice. *J Virol.* 94:12. e00323-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00323-20>.

- Simpson, S., Kaufmann, M.C., Glozman, V. y Chakrabarti. A. (2020). Disease X: accelerating the development of medical countermeasures for the next pandemic. *Lancet*. 20. e108-e115. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30123-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30123-7).
- Singh. H., y Raghava, G. P. (2001) ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. *Bioinformatics*. 17. 1236-1237.
- Skala, W., Goetting, P. y Brandstetter, H., (2013). Do-it-yourself histidine-tagged bovine enterokinase: A handy member of the protein engineer's toolbox. *J Biotechnol*. 168:4. 421-425.
- Skalickova, S., Heger, Z., Krejcova, L., Pekarik, V., Bastl, K., Janda, J., et al. (2015) Perspective of use of antiviral peptides against influenza virus. *Viruses*. 7:10. 5428-5442. doi: <https://doi.org/10.3390/v7102883>.
- Sleeman, K., Mishin, V.P., Deyde, V. M., Furuta, Y., Klimov, A.I., y Gubareva L. V. (2010). *In vitro* antiviral activity of favipiravir (T-705) against drug-resistant influenza and 2009 A(H1N1) viruses. *Antimicrob Agents Chemother*. 54. 2517-2524.
- Smith, G.J., Vijaykrishna, D., Bahl, J., Lycett S.J., Worobey, M., Pybus, O.G., et al. (2009). Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*. 459:1122-1125. doi: 10.1038/nature08182. PMID: 19516283
- Spackman, E. (2014). *Animal Influenza Virus. Methods and Protocols*. New York: Humana Press.
- Stills, H. F. (2012). Chapter 11. Polyclonal Antibody Production. In *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster and Other Rodents*, Academic Press, Boston, pp. 259-274.
- Stills, H. F. Jr. (2005). Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR J*. 46:280-293.
- Surzycki, R., Greenham, K., Kitayama, K., Dibal, F., Wagner, R., Rochaix, J., et al. (2009). Factors affecting expression of vaccines in microalgae. *Biologicals*. 37. 133–138. doi: 10.1016/j.biologicals.2009.02.005.
- Takashita E. (2020). Influenza polymerase inhibitors: mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. a038687 doi: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038687>.
- Toots, M. y Plemper, R.K. (2020). Next-generation direct-acting influenza therapeutics. *Transl Res*. 220. 33-42. doi: 10.1016/j.trsl.2020.01.005.
- Tran, M., Henry, R. E., Siefker, D., Van, C., Newkirk, G., Kim, J., et al. (2013). Production of anti-cancer immunotoxins in algae: ribosome inactivating proteins as fusion partners. *Biotechnol Bioeng*. 110. 2826–2835. doi: 10.1002/bit.24966
- Treanor, J., J., Schiff, G., M., Hayden, F., G., Brady, R., C., Hay, C., M., Meyer, A., L., Holden-Wiltse, J., Liang, H., Gilbert, A. y Cox, M. (2007) Safety and immunogenicity of a 55

baculovirus-expressed hemagglutinin influenza vaccine: a randomized controlled trial. *JAMA*. 297. 1577-1582.

- Voutssas-Lara, J., Cervantes-Torres, J., Hernández, M., Bobes, R. J., Lamoyi, E., Vázquez-Ramírez, R., et al. (2021). Influence of adjuvants on the amount, specificity and functional activity of antibody response to human influenza vaccine in mice. *Mol immunol*. 135. 398–407. doi: 10.1016 / j.molimm.2021.05.003.
- Ward, B., J., Séguin, A., Couillard, J., Sonia Trépanier. S, y Landry, N. (2021). Phase III: Randomized observer-blind trial to evaluate lot-to-lot consistency of a new plant-derived quadrivalent virus like particle influenza vaccine in adults 18–49 years of age. *Vaccine*. 39:10. 1528-1533. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.01.004>.
- Ward, B., J., Seguin, A., Pillet, P., Trepanier, S., Dhaliwall, J., Libman, M.D., Vesikari, T. y Landry, N. (2020). Efficacy, immunogenicity, and safety of a plant-derived, quadrivalent, virus-like particle influenza vaccine in adults (18–64 years) and older adults (>65 years): Two multicenter, randomized phase 3 trials. *The Lancet*. 396. 1491–1503. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32014-6.
- Webby, R. J., Aktories, K., Freiburg, L., and Cooper, M. D. (2013). Current Topics in Microbiology and Immunology Vol. 370: Swine Influenza. Available at: <http://www.springer.com/series/82> (Accessed December 1, 2020).
- World Health Organization (2010). Pandemic (H1N1) 2009: frequently asked questions. Disponible online: http://www.who.int/csr/disease/swineflu/frequently_asked_questions/en/ (Consultado el 26 de febrero del 2019).
- World Health Organization (2019). Influenza. Disponible online: <https://www.who.int/influenza/en/>. (Consultado el 26 de febrero del 2019)
- Wu, L. C. y Zarrin, A. A. (2014). The production and regulation of IgE by the immune system. *Nat Rev Immunol*. 14:247.
- Ziegler, M. T., Thomas, S. R. y Danna, K. J. (2000). Accumulation of a thermostable endo-1,4-β-D-glucanase in the apoplast of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Mol Breed*. 6. 37–46. doi: 10.1023/A:1009667524690.