



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Producción de proteínas recombinantes contra el
Virus Sincicial Respiratorio en dos sistemas de
expresión: *Escherichia coli* y plantas de tabaco**

Tesis que presenta

Judith Estefanía López Ponce

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

San Luis Potosí, S.L.P., junio de 2024



Constancia de aprobación de tesis

La tesis “**Producción de proteínas recombinantes contra el Virus Sincicial Respiratorio en dos sistemas de expresión: *Escherichia coli* y plantas de tabaco**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Judith Estefanía López Ponce** y aprobada el **20 de junio del 2024** 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
Director de la tesis

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Rubén Hipólito López Revilla
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., bajo la dirección del Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías No. de registro 1241607 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. y apoyo de recursos fiscales del IPICYT. Además, utilizó la infraestructura del LANBAMA para la realización de los experimentos.

Página en blanco que se va a utilizar para colocar la copia del acta de examen.

A mis padres Saúl López y Ángeles Ponce que en todo momento han apoyado mis decisiones académicas.

A mis hermanos Denisse y Ángel por siempre creer en mis capacidades.

Angel Mares Wehr por alentarme y ayudarme a ser mejor en cada uno de los aspectos de mi vida.

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco al Dr. Ángel Alpuche por permitirme formar parte del grupo del Laboratorio de Biología Molecular de Plantas, por sus enseñanzas y orientación en mi trabajo de investigación.

A la Dra. Benita Ortega por trasmitirme sus conocimientos, brindarme herramientas para aprender las técnicas del laboratorio, su supervisión y su comunicación efectiva para mejorar los resultados del proyecto.

A mi comité tutorial la Dra. Irene Castaño y el Dr. Rubén López que me otorgaron excelentes y acertados comentarios para mejorar mi trabajo escrito.

A los técnicos del Laboratorio 1, la QFB Rosy Castillo y el Biol. Salvador Ambriz por la capacitación para usar los equipos de laboratorio y ayuda en la obtención del material necesario para realizar mis experimentos.

A mis compañeros de Laboratorio 1 por su contribución a algunos de mis experimentos y a mis amigos del IPICYT por sus consejos y apoyo.

A la Sra. Rosita Cruz que siempre nos ayuda a mantener orden en el laboratorio y en el cubículo de estudiantes.

Al Dr. Gerardo Argüello y al Dr. Samuel Lara por sus buenos comentarios sobre el trabajo de tesis y su disposición para apoyar.

Al Dr. Edgar Páez por sus sabios consejos y la ayuda en la obtención de la purificación de las dos proteínas recombinantes obtenidas en bacteria.

Al LANBAMA por el uso de sus instalaciones y a las compañeras de mencionado laboratorio por su orientación en la utilización de equipos.

Al IPICYT por la oportunidad que me otorgó de realizar mi maestría en sus instalaciones, los aprendizajes y facilidades brindadas.

Al CONAHCYT por la beca otorgada.

Contenido

Créditos institucionales	iii
Agradecimientos	vi
Abreviaturas	xii
Resumen	xiii
Abstract	xiv
1. Introducción	1
1.1 Virus Sincicial Respiratorio	3
1.1.1 Virología	3
1.1.2 Polimorfismo de la proteína F	6
1.1.3 Patogenicidad	8
1.1.4 Inmunología	11
1.1.5 Epidemiología	12
1.2 Profilaxis contra el VSR	14
1.2.1 Vacunas	14
1.2.2 Anticuerpos monoclonales	16
1.3 Modelos de expresión de proteínas recombinantes	18
1.3.1 Expresión de proteínas en <i>Escherichia coli</i>	18
1.3.2 Expresión transitoria de proteínas en plantas de tabaco	19
2. Objetivos	24
2.1 Objetivo general	24
2.2 Objetivos específicos	24
3. Resultados	26
3.1 Diseño de gen sintético <i>PreFVac</i>	26
3.2 Sistemas de expresión	18
3.2.1 <i>Escherichia coli</i>	18
3.2.1.1. Verificación de las construcciones de los genes <i>BFVax</i> y <i>PreFVac</i> en pET28 b (+)	18
3.2.1.2 Purificación de proteínas recombinantes BFVax y PreFVac	21
3.2.1.3 Identificación de las proteínas recombinantes BFVax y PreFVac	23
3.2.1.4 Cuantificación por el método de Bradford de proteína insoluble total en las muestras purificadas de BFVax y PreFvac	25
3.2.2 Plantas de tabaco	27

3.2.2.1 Estandarización de la técnica de “Magniffection”	27
3.2.2.2 Construcciones de <i>BFVax</i> y <i>PreFVac</i> clonados en pICH11599	29
3.2.2.3 Detección de las proteínas BFVax y PreFVac producidas en plantas de tabaco por el método de “Magniffection”	34
4. Discusión	37
4.1 Producción de BFVax y PreFVac en <i>E. coli</i>	38
4.2 Producción de BFVax y PreFVac en plantas de tabaco por el método de Magniffection	40
5. Conclusiones	43
6. Perspectivas	44
7. Metodología	45
7.1 Diseño de la proteína antigénica PreFVac <i>in silico</i>	45
7.2 Sistemas de expresión	47
7.2.1 <i>Escherichia coli</i>	47
7.2.1.1 PCR y perfil de restricción para verificar la presencia de los genes <i>BFVax</i> y <i>PreFVac</i> en pET28 b (+)	47
7.2.1.2 Expresión y extracción de las proteínas BFVax y PreFVac	49
7.2.1.3 Purificación de proteínas recombinantes	50
7.2.1.4 Western blot	50
7.2.1.5 Concentración de proteína por centrifugación	51
7.2.1.6 Método de Bradford	51
7.2.2 Plantas de tabaco	53
7.2.2.1 Estandarización de la técnica de Magniffection	53
7.2.2.2 PCR de la construcción del gen <i>BFVax</i> en pICH11599	54
7.2.2.3 Subclonación del gen de interés <i>PreFVac</i> en pICH11599	54
7.2.2.4 Perfil de restricción y PCR de la construcción del gen <i>PreFVac</i> en pICH11599	54
7.2.2.5 Expresión transitoria y extracción de BFVax y PreFVac en plantas de tabaco por el método de Magniffection	55
7.2.2.6 Dot blot	56
8. Bibliografía	57
9. Anexos	61
9.1 Material y equipo	61
9.1.1 Biológico	61

9.1.2 Reactivos	63
9.1.3 Equipos	67

Lista de tablas

Tabla 1. Función de las proteínas del VSR	5
Tabla 2. Tipos de vacunas en estudio contra el VSR	15
Tabla 3. Anticuerpos monoclonales contra VSR	17
Tabla 4. Secuencias seleccionadas para el diseño de la proteína PreFVac	27
Tabla 5. Resultados del análisis bioinformático de la proteína antigénica PreFVac	27
Tabla 6. Promedio de las absorbancias obtenidas a 595 nm de la curva de BSA	25
Tabla 7. Oligonucleótidos que amplifican región del gen <i>BFVax</i>	48
Tabla 8. Mezcla de reactivos de PCR	48
Tabla 9. Condiciones de PCR	48
Tabla 10. Oligonucleótidos que amplifican región del gen <i>PreFVac</i>	55

Lista de figuras

Figura 1. Esquema del genoma del VSR	4
Figura 2. Conformaciones de la proteína F del VSR	7
Figura 3. Esquema del ciclo de replicación del VSR en la célula hospedera	9
Figura 4. Vectores virales usados en el método de Magniffection	21
Figura 5. Esquema de ensamblaje in planta de los provectores virales	23
Figura 6. Esquemas de la construcción de las proteínas PreFVax y BFVax	28
Figura 7. Modelado de la proteína PreFVax <i>in silico</i>	17
Figura 8. Productos de PCR de la construcción del gen <i>BFVax</i> -Pet28b (+)	19
Figura 9. Perfil de restricción de la construcción del gen <i>PreFVax</i> -pET28 b (+)	20
Figura 10. Geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie de muestras purificadas de las proteínas BFVax y PreFVax producidas en <i>E. coli</i>	22
Figura 11. Western blot de las proteínas purificadas producidas en <i>E. coli</i>	24
Figura 12. Curva de Bradford	26
Figura 13. Expresión de GFP por método de “Magniffection”	28
Figura 14. Productos de PCR de la construcción del gen <i>BFVax</i> -pICH11599	30
Figura 15. Perfil de restricción y productos de PCR de la construcción del gen <i>PreFVax</i> -pICH11599	32
Figura 16. Simulación en snapgene de alineamiento de la secuencia de DNA original y secuencia de DNA del gen <i>PreFVax</i> en el vector de expresión	33
Figura 17. Western blot de extracción de la proteína BFVax y PreFVax en plantas de tabaco	35
Figura 18. Dot blot de extracción de la proteína PreFVax en plantas de tabaco	36
Figura 19. Herramientas bioinformáticas para el diseño <i>in silico</i> de la proteína PreFVax	46

Abreviaturas

CCL5	Ligando de quimiocina con motivo C-C
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
FDA	Food and Drug Administration
FNT α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
GSK	GlaxoSmithKline
HRP	Peroxidasa de rábano
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina
IRA	Infección Respiratoria aguda
LAV	Vacunas vivas atenuadas
LPS	Lipopolisacárido
mAb	Anticuerpo monoclonal
MIP 1α	Proteína inflamatoria de macrófagos – 1 alfa
mRNA	RNA mensajero
OD	Densidad óptica
PIA	Países desarrollados con altos ingresos
Post-F	Proteína de Post-fusión
Pre-F	Proteína de Pre-fusión
PVX	Virus X de la papa
RdRp	ARN polimerasa dependiente de ARN
RPN	Ribonucleocápside naciente
Th	Células T auxiliares
TMV	Virus del mosaico del tabaco
VSR	Virus Sincicial Respiratorio

Resumen

Producción de proteínas recombinantes contra el Virus Sincicial Respiratorio en dos sistemas de expresión: *Escherichia coli* y plantas de tabaco.

El Virus Sincicial Respiratorio (VSR) es un virus que afecta a personas de todas las edades, sin embargo, puede causar una infección respiratoria aguda (IRA) en infantes y adultos mayores de 60 años. Este virus suele aparecer en la época de otoño a invierno y se estima que infecta a 64 millones de personas y causa 160,000 muertes por año a nivel mundial. Recientemente la FDA aprobó dos vacunas basadas en la secuencia de la proteína de pre-fusión del VSR (pre-F), las cuales aún no están disponibles en países de bajos ingresos. En este trabajo se emplearon dos sistemas de expresión para producir proteínas recombinantes contra el VSR, que puedan usarse como un prototipo de vacuna; en primer lugar, se seleccionó a *Escherichia coli* por su rápido crecimiento y rentabilidad y en segundo lugar a las plantas de tabaco por ser una plataforma prometedora debido a su rentabilidad, escalabilidad y la facilidad de posible uso en vacunación oral. En nuestro grupo de investigación contamos con el gen *BFVax* que contiene regiones que codifican epítomos de la proteína F del VSR, y adicionalmente se diseñó un nuevo gen *PreFVac*, que contiene regiones de la proteína de pre-fusión del VSR y otras regiones relevantes para mejorar la construcción. Se indujo la expresión de ambas proteínas en *E. coli* con IPTG 1mM y se realizó la extracción por medio de lisis bacteriana y purificación por columna con resina de níquel. Por otro lado, se realizó la expresión transitoria de la proteína *BFVax* y *PreFVac* en tabaco por el método de módulos de vectores virales “Magniffection” y la transformación se realizó por agroinfiltración. La mayor cantidad de proteínas recombinantes extraídas de bacterias se encontraron en la fracción insoluble y después de su purificación se detectaron por Western blot. Además, las fracciones obtenidas de la purificación se concentraron y diluyeron en PBS y se cuantificaron por el método de Bradford, obteniendo los resultados de 292 µg/mL de *PreFVac* y de 24 µg/mL de *BFVax* de la proteína insoluble total. En cuanto a las proteínas obtenidas en planta, se pudieron detectar por Western blot y dot blot. Se lograron expresar y purificar en *E. coli*, dos proteínas putativamente antigénicas para VSR, además ambas se produjeron en tabaco por el método de Magniffection. Se pretende usar estas cuatro proteínas en ensayos de inmunización para comparar su eficiencia biológica.

Palabras clave: Proteínas antigénicas recombinantes, sistemas de expresión, proteína de pre-fusión.

Abstract

Production of recombinant proteins against Respiratory Syncytial Virus in two expression systems: *Escherichia coli* and tobacco plants.

Respiratory Syncytial Virus is a virus that affects people of all ages; however, it can cause an acute respiratory infection (ARI) in infants and adults over 60 years. This virus appears in the fall to winter season and is estimated to infect 64 million people and to cause 160,000 deaths per year worldwide. Recently, FDA approved two vaccines based on the RSV pre-fusion protein (pre-F) sequence, which are not yet accessible to low-income countries. In this work, two expression systems were used to produce antigenic recombinant RSV proteins that may serve as a prototype vaccine; first, *E. coli* was selected for its rapid growth and profitability and secondly, tobacco plants for being a promising platform and their cost-effectiveness, scalability, and ease of possible use in oral vaccination. Our research group has the *BFVax* gene containing regions encoding epitopes of the RSV F protein and additionally a new *PreFVax* gene was designed, containing regions of the RSV pre-fusion protein and other relevant regions to improve the construct. Protein expression was induced in *E. coli* with 1mM IPTG and the extraction was performed by bacterial lysis; purification was performed by column with nickel resin. On the other hand, transient expression of *BFVax* protein was performed in tobacco by the method of viral vector modules "Magniffection" and transformation was performed by agroinfiltration. The highest amount of recombinant proteins extracted from bacteria were found in the insoluble fraction and after purification they were detected by Western blot. Furthermore, the fractions obtained from the purification were concentrated and diluted in PBS and quantified by the Bradford method, obtaining the results of 292 µg/mL of PreFVax and 24 µg/mL of BFVax of the total insoluble protein. As for the proteins obtained in plant, they could be detected by Western blot and dot blot. It was possible to express and to purify in *E. coli* two proteins putatively antigenic against RSV, additionally both were produced in tobacco by the Magniffection method. We intend to use these four proteins in immunization assays to compare their biological efficiency.

Keywords: Recombinant antigenic proteins, expression systems, pre-fusion protein.

1. Introducción

El Virus Sincicial Respiratorio (VSR) es un virus de importancia clínica ya que se reporta como la principal causa de infecciones agudas del tracto respiratorio (IRA) (Divarathna *et al.* 2023). Este virus es el principal causante de bronquiolitis y el responsable del 31% de neumonías a nivel global (Mazur *et al.* 2023). Cada año en Estados Unidos causa de 58,000-80,000 hospitalizaciones y de 100 a 300 muertes de niños menores de 5 años y 60,000 – 160,000 hospitalizaciones y de 6,000 – 10,000 muertes de adultos mayores de 65 años (CDC 2023). Se estima un costo de gastos médicos directos mayor a los 3 millones de dólares al año en países de bajo y medio ingreso (Zhang *et al.* 2020). El VSR suele ser estacional, con mayor incidencia en temporadas de otoño e invierno (CDC 2023). Los factores de riesgo incluyen partos prematuros, gestación múltiple, falta de unidades de cuidados intensivos neonatales, falta de lactancia materna, infecciones durante los primeros 6 meses de vida, antecedentes familiares de atopia, enfermedades crónicas y cardiopatía congénita (Bulkow *et al.* 2002).

El desarrollo de una vacuna contra VSR ha sido un desafío, ya que en los primeros intentos de desarrollo se inactivó el virus con formaldehído y se generó una enfermedad exacerbada por VSR como resultado de una alta infiltración de neutrófilos en los pulmones (Kim *et al.* 1969). También se propició un desequilibrio de la respuesta inmune Th1/Th2 con sobreproducción de citocinas de respuesta Th2 y se produjo eosinofilia (Knudson *et al.* 2015), por lo que los trabajos posteriores se han enfocado en generar un mejor balance en la respuesta inmunitaria.

En la actualidad combatir la infección grave por VSR en lactantes se logra mediante inmunización pasiva con un anticuerpo monoclonal humanizado anti-VSR neutralizante

conocido como Palivizumab (PVM), indicado solo en pacientes de alto riesgo como bebés prematuros, menores de 6 meses de vida o lactantes con cardiopatías congénitas (Garegnani *et al.* 2021). Además, en el 2023 se aprobó el anticuerpo monoclonal nirvesimab y las vacunas Arexvy de GSK y Abrysvo de Pfizer (CDC 2023), sin embargo, países de bajos ingresos no tienen la facilidad de adquirirlas rápidamente.

Existen diversas plataformas de expresión para producir proteínas recombinantes, sin embargo, la selección de alguna de ellas depende de sus ventajas y el objetivo que se busca alcanzar. El sistema de expresión de proteínas en *Escherichia coli* fue el primero y el más simple y en la actualidad sigue siendo de los más empleados, debido a su fácil manipulación genética, crecimiento rápido y costos reducidos de producción (Rosano y Ceccarelli 2014).

El desarrollo de biofármacos a base de material vegetal ha tomado gran importancia, tanto que en la actualidad existen investigaciones y tratamientos aprobados que se han basado en la tecnología de la producción de proteínas en planta. Existen dos tipos de transformación en planta que son la estable y la transitoria, sin embargo, la primera ha tenido poca eficiencia de producción y en la segunda se ha implementado un método conocido como Magniffection, que consiste en el uso de provectores virales que infectan a la planta por medio de agrobacterias y subsecuentemente producen una proteína recombinante de interés de la cual se ha obtenido hasta un 80% de producción proteína soluble total (Marillonnet *et al.* 2004).

1.1 Virus Sincicial Respiratorio

1.1.1 Virología

VSR pertenece a la familia Paramyxoviridae, orden Mononegavirales y género Pneumovirus (Collins y Karron 2013). El virión está conformado por un complejo de ribonucleoproteína helicoidal resistente a nucleasas (nucleocápside) que contiene el genoma de ARN monocatenario no segmentado de sentido negativo, compuesto por alrededor de 15,000 nucleótidos; la nucleocápside está cubierta por una envoltura lipídica donde se encuentran las glicoproteínas de la superficie del virus F, G y SH (Collins 1991). Los viriones de VSR son partículas esféricas y filamentosas que miden 12 µm de longitud con un diámetro de 60 a 200 nm y emergen en la superficie de las células infectadas (Ke *et al.* 2018).

El genoma de VSR contiene 10 genes que se transcriben en 10 secuencias de mRNA. Además, el genoma del VSR cuenta con una región no codificante y regiones intergénicas que separan cada gen. Los genes se traducen en 11 proteínas (Fig. 1) llamadas NS1 (no estructural 1), NS2 (no estructural 2), N (nucleoproteína), P (fosfoproteína), M (de matriz), SH (hidrófoba corta), G (glucoproteína de unión), F (de fusión), M2-1, M2-2 (factores de procesividad de transcripción 1 y 2, respectivamente), L (ARN polimerasa dependiente de ARN) (Collins y Karron 2013). La función de las proteínas se detalla en la Tabla 1.



Figura 1. Esquema del genoma del VSR. Representa las secuencias codificantes de cada proteína, la línea gris equivale a las regiones intergénicas. NS1 (no estructural 1), NS2 (No estructural 2), N (nucleoproteína), P (fosfoproteína), M (de matriz), SH (hidrófoba corta), G (glucoproteína de unión), F (de fusión), M2-1, M2-2 (factores de procesividad de transcripción 1 y 2 respectivamente), L (ARN polimerasa dependiente de ARN). Modificado de (Collins *et al.* 2013)

Tabla 1. Función de las proteínas del VSR.

Tipo	Proteína	Función
Glicoproteínas de superficie	F	Es necesaria para la entrada, fusión y ensamble del virus y contribuye a la formación de sincicios.
	G	Es la responsable de la evasión inmune. Modera la unión entre la membrana viral y la membrana plasmática de la célula hospedera.
	SH	No se entiende bien su función, pero algunos estudios sugieren que puede ser auxiliar a la proteína F durante la fusión, aunque no es indispensable para las funciones de F.
Proteínas asociadas a la nucleocápside	N	Envuelve al genoma de manera que crea un complejo de ribonucleoproteína helicoidal resistente a las nucleasas.
	P	Es un cofactor de la ARN polimerasa viral; se une formando una red con otras proteínas para la replicación y la transcripción.
	L	ARN polimerasa viral
Proteína de la matriz	M2-1	Sirve como factor de procesividad y anti-terminador transcripcional.
	M2-2	Factor regulador de la transcripción.
	M1	Es la principal responsable de la interacción entre la nucleocápside y la envoltura.
Proteínas no estructurales	NS1	Forman un complejo de degradosoma no estructural que ayuda a desintegrar proteínas involucradas en la inmunidad innata Inhibición de IFN tipo I y II.
	NS2	

(Talukdar *et al.* 2023)

1.1.2 Polimorfismo de la proteína F

La proteína F sufre diversas conformaciones, ya que ésta primeramente se sintetiza como proteína F₀ y después por múltiples glicosilaciones ligadas a la proteína N, F₀ cambia post-traduccionalmente donde se somete a una escisión proteolítica en los aminoácidos número 109 y 137 mediante una proteasa similar a la furina, con lo que se elimina un péptido de 27 aminoácidos mencionado en algunos escritos como Pep27 (McLellan *et al.* 2013). Este proceso ocurre en la red trans-Golgi que al transportar las proteínas de fusión a la membrana plasmática genera 2 subunidades: la primera se le da por nombre F2 ubicada en el amino terminal y la segunda es la F1 que se encuentra en el carboxilo terminal, ambas se encuentran conectadas en la conformación de un protómero heterodímero y la forma madura está conformada por 3 de ellos, que se le conoce como la proteína de pre-fusión, al ser una conformación inestable se repliega en una conformación de post-fusión que tiene mayor estabilidad (Bolt *et al.* 2000). La proteína F es la que menos diversidad antigénica sufre con un 5% de diferencia entre los subgrupos VSR A y VSR B. También es importante mencionar que las proteínas de pre-fusión (Pre-F) y post-fusión (Post-F) tienen diferentes sitios antigénicos localizados en sus conformaciones, conocidos como Φ , I, II, III, IV, V (Fig. 2) (Graham 2017).

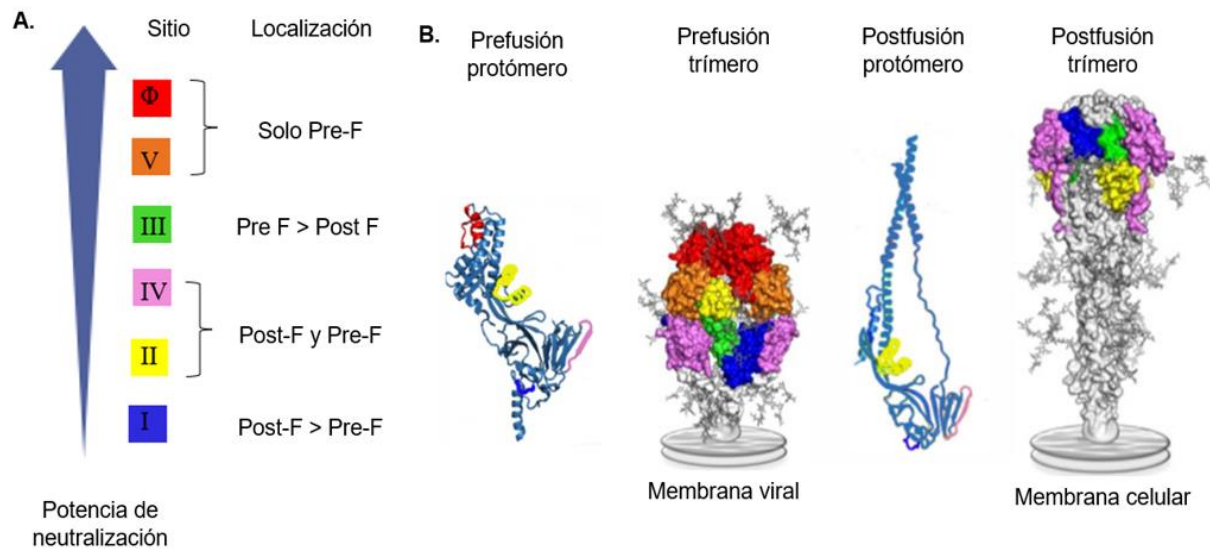


Figura 2. Conformaciones de la proteína F del VSR. **A.** Se muestra la potencia de neutralización de menor a mayor de cada uno de los sitios antigénicos presentes en las conformaciones pre-F y post-F de la proteína F. **B.** Diversas conformaciones de la proteína F, la forma trimérica de cada una representa la forma madura. Imagen modificada de (Graham, 2017).

1.1.3 Patogenicidad

La infección por VSR ocurre en las células epiteliales nasales, en específico en el lado apical de las células ciliadas y en los pulmones infecta particularmente a los neumocitos de tipo I.

El ciclo de infección comienza con la entrada del virus que consta de 2 etapas; primero es la unión del virión a la célula huésped con ayuda de la proteína G y por consiguiente la fusión de las membranas de ambos cuerpos celulares, lo que está mediado por la proteína F, después de que se han liberado enzimas proteolíticas de la célula infectada. La fusión de la membrana viral y la membrana plasmática de la célula huésped tiene como función liberar la nucleocápside y ARN genómico del virión en el citoplasma de la célula que se infectó y así permitirles a las demás proteínas del virión iniciar la transcripción y replicación del genoma (Fig. 3) (Collins 1991).

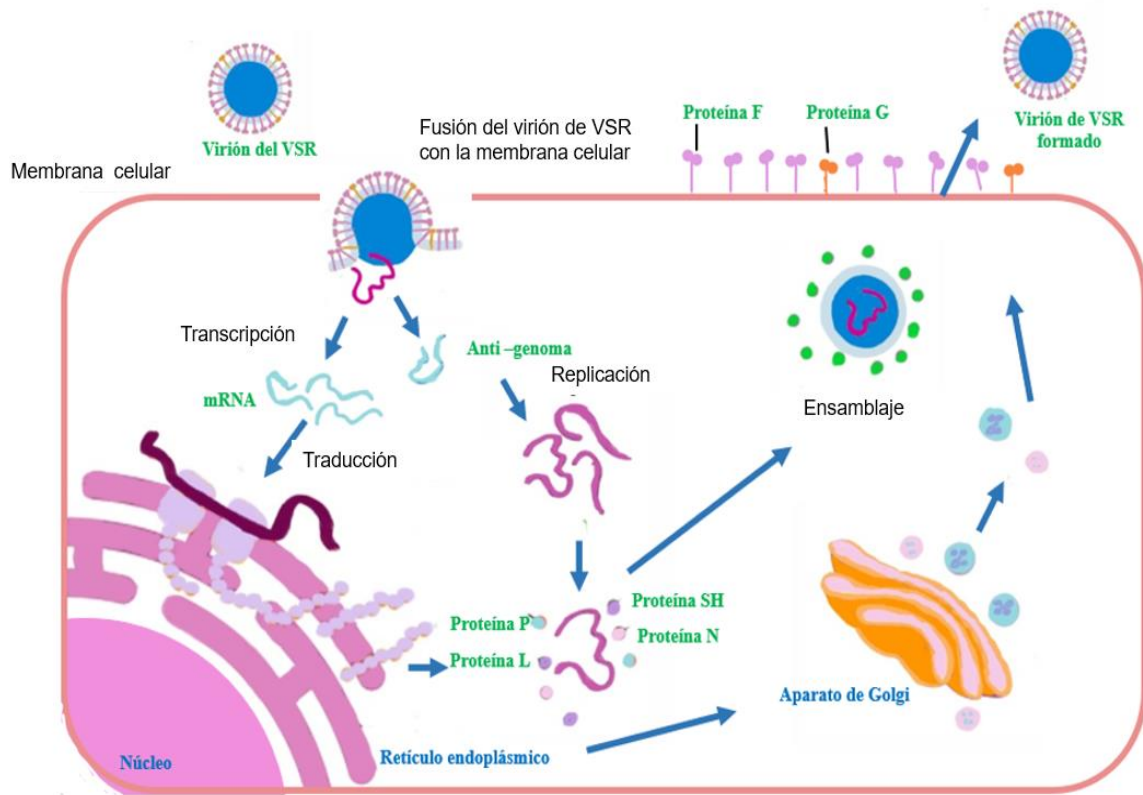


Figura 3. Esquema del ciclo de replicación del VSR en la célula hospedera. El virión del VSR entra en la célula hospedera con ayuda de la proteína G que modera la unión de las membranas viral y la membrana de la célula hospedera y la proteína F que permite la fusión de ambas membranas y se libere el ARN del virus que posteriormente se transcribe y se traduce a las proteínas necesarias para ensamblar otro virión que salga de la célula e infecte a otras. Imagen modificada de (Collins, 1991).

La transcripción del genoma viral necesita de un complejo de polimerasa, el cual está compuesto por proteínas asociadas a la nucleocápside: N, P y L. Este complejo transcribe completamente el genoma del VSR de forma consecutiva 3' a 5' (Collins 1991).

Para poder replicar el genoma viral *de novo* se necesita producir un anti-genoma, es decir, replicar el genoma completo, pero en sentido positivo (+) a manera de intermediario. Esto se realiza por el complejo de polimerasa mencionado anteriormente. No hay mucha información al respecto de la regulación de la transición de transcripción y replicación, pero es un hecho que M2-2 tiene un papel fundamental para la producción de ARN genómico y anti genómico. El ARN del virus es encapsulado por la proteína N, para así generar una RPN (ribonucleocápsides nacientes) helicoidal que actuará como plantilla para posteriores síntesis de ARN. Las copias genómicas que den como resultado ARN viral se ensamblarán en viriones (Collins 1991).

El ensamblaje es coordinado por la proteína M que se incorpora a los cuerpos de inclusión citoplasmáticos, donde se relaciona con RNP preformada que engloba a las proteínas N, P, L y M2-1. Además, la proteína M se adhiere a las balsas lipídicas donde interacciona con las glicoproteínas de superficie y al obtener el virión maduro, es decir los complejos de las glicoproteínas con los RNP, éste se separa de la membrana apical y brota fuera de la célula. Debido a la propagación del virus de célula a célula mediante la fusión de las membranas plasmáticas de las células huéspedes adyacentes se obtienen los característicos “sincicios” que son cúmulos de células infectadas por VSR, estos son peculiares del mencionado virus, además de las lesiones epiteliales que causa la infección en el tracto respiratorio superior lo que conlleva a una mayor accesibilidad a

vías respiratorias inferiores donde el VSR ya ocasiona síntomas por infecciones graves (Collins 1991).

1.1.4 Inmunología

Al nacer los bebés tienen protección por inmunoglobulinas heredadas de la madre contra la infección por VSR, sin embargo, es variable entre los individuos y suele disminuir rápidamente en los primeros 6 meses de vida (Wilkins *et al.* 2023).

Cuando los bebés menores a 6 meses contraen la infección por VSR primaria, la inmunidad humoral es característica, ya que la IgA se produce en las mucosas, pero cuando sobrepasan la edad de 6 meses, suelen haber respuestas humorales con títulos más altos de anticuerpos. Seguramente habrá casos de reinfección del VSR a lo largo de la vida, lo que aumentará también la respuesta inmunitaria contra el patógeno (Glezen *et al.* 1981).

Se ha encontrado que hay mayor resistencia a la reinfección por VSR en sujetos que tienen títulos de anticuerpos séricos altos (IgG e IgM mayormente), a diferencia de los que tienen títulos altos de anticuerpos secretores como lo son las IgA, que están presentes en la mayoría de las mucosas secretoras del organismo (Glezen *et al.* 1981).

Cuando ocurre la infección por VSR, las células epiteliales y macrófagos alveolares son los que activan la inmunidad celular, de manera que liberan sustancias como quimiocinas, citocinas proinflamatorias y mediadores: Interleucina (IL); IL1, FNT α (Factor de Necrosis Tumoral α), IL-6, IL-8, Proteína inflamatoria de macrófagos 1 α (MIP 1 α por sus siglas en inglés) y ligando 5 de quimiocina (CCL5) los cuales se dirigen hacia las vías respiratorias y extienden la respuesta inflamatoria, además de que parecen ser

responsables también de los síntomas respiratorios de infección por VSR como por ejemplo inflamación de las vías aéreas y la hiperreactividad bronquial (Garofalo *et al.* 2005).

Las personas con inmunodeficiencia de respuesta inmune mediada por células desarrollan una infección por VSR poco común, pero con signos de gravedad como alta replicación del virus en las vías respiratorias y neumonía. Otra respuesta importante contra la infección del VSR, son la presencia de las células T auxiliares (Th). Las Th1 tienen como función producir IL-2, IFN γ y linfotóxina, en cuanto las Th2 secretan otro tipo de sustancias como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 (Openshaw 2002).

1.1.5 Epidemiología

La presencia de VSR ha recibido un mayor interés a nivel mundial, debido a que el 99% de las muertes de lactantes ocurren en países de bajos ingresos y medios (Mazur *et al.* 2023).

El VSR no es tan fácilmente detectable debido a las carencias de conocimiento o herramientas para poder detectarlo, además de que sus síntomas son parecidos a los del resfriado común lo que también es un sesgo para determinar la presencia del virus, por esta razón hay un estimado de que 50% de los niños infectados por VSR mueren fuera del hospital en países en desarrollo, catalogando a la pobreza como un factor sustancial (Mazur *et al.* 2023).

A nivel global el 31% de casos de neumonía son causados por VSR. Las muertes pediátricas en el hospital son de 20 a 50% en infantes de 2 a 4 meses y fuera del hospital son de 50 a 80% en infantes de 1 a 5 meses (Mazur *et al.* 2023).

En Estados Unidos se estima que por año el VSR causa 58,000 a 80,000 hospitalizaciones de niños menores de 5 años, de los cuáles 100 a 300 mueren por enfermedad grave de VSR. En el caso de adultos mayores de 65 años, 60,000 a 160,000 son hospitalizados por infección de VSR de los cuales de 6,000 a 10,000 mueren por esta enfermedad (CDC 2023).

Se ha demostrado que las incidencias de infección por VSR ocurren cada invierno. En países fríos es común que se realicen aproximadamente 1,000 diagnósticos de VSR por semana, y en su mayoría corresponden a niños menores de 5 años y en países con climas tropicales suele haber una alta asociación de VSR con días lluviosos. También otros factores que se asocian son festividades, regreso a clases, hacinamiento, transmisión por aerosoles de personas infectadas en áreas con mala ventilación, etc. (Srikantiah *et al.* 2021).

El virus sincicial respiratorio es la segunda causa de mortalidad infantil, las muertes son comunes en países de ingresos medios y bajos, lo que permite concluir que la pobreza es un factor de riesgo, ya que en estos países más del 50% de los lactantes infectados mueren fuera del hospital (Srikantiah *et al.* 2021). A diferencia de los países desarrollados con altos ingresos (PIA) los que llegan a tener infecciones respiratorias graves por VSR, son lactantes con alguna afección como la prematurez, enfermedades cardíacas congénitas, enfermedades pulmonares crónicas, síndrome de Down y trastornos neuromusculares (Bulkow *et al.* 2002).

También las personas mayores de 60 años, se consideran un grupo susceptible para contraer una enfermedad respiratoria grave por VSR, de manera que se ha convertido en una causa común de morbilidad y mortalidad.

1.2 Profilaxis contra el VSR

1.2.1 Vacunas

En el año de 2023, la FDA aprobó una vacuna contra el VSR dirigida a adultos mayores de 60 años, conocida como Arexvy de la industria farmacéutica GSK, en la cual, al realizar los estudios clínicos para evaluar su efectividad y seguridad, se obtuvo que la mayoría de los participantes tuvo una reducción en el riesgo de desarrollar una enfermedad del tracto inferior respiratorio (CDC 2023) . Otra vacuna aprobada fue la llamada Abrysvo de Pfizer para adultos mayores de 60 años y también está indicada en mujeres que tengan de 32 a 36 semanas de embarazo durante la temporada de infecciones por VSR que suele ser de septiembre a enero. Hay estudios recientes donde se utilizan diferentes tecnologías para obtener una vacuna contra VSR (Tabla 2), y las vacunas que recientemente se aprobaron son a base de subunidades que contienen regiones de la secuencia de la proteína de pre-fusión del VSR (Mazur *et al.* 2023).

Tabla 2. Tipos de vacunas en estudio contra el VSR.

Tipo de vacuna	Características
Vacunas vivas atenuadas (LAV)	Consiste una inmunización activa en lactantes mayores a 6 meses y provocan una potente respuesta inmunitaria. Su diseño incluye un antígeno y una respuesta local, que imita la infección natural, pero a la par se realiza una atenuación del virus.
Quimérica	Expresa las proteínas de VSR en virus atenuados, que ya han sido estudiados y tienen un perfil de seguridad adecuado. Al favorecer la presentación de antígeno, activa la respuesta inmune adaptativa.
Subunidad	Consiste en expresión de proteínas del VSR que ayudan a activar el sistema inmunitario; se ha evitado este tipo de vacuna para los niños que aún no se infectan de VSR ya que exacerban la enfermedad.
Basada en partículas	Aprovechan el potencial inmunogénico para mostrar múltiples antígenos del virus mediante el ensamble de partículas.
Ácido nucleico	Se basa en la utilización de ARN mensajero (ARNm) de manera que éste ingresa a la célula donde se traduce la proteína de interés, que comúnmente es una proteína con alto grado de antigenicidad para que provoque la reacción del sistema inmunitario.
Vectores recombinantes	Usa un virus modificado con replicación defectuosa para inducir inmunidad humoral y celular mediante la administración de antígenos para VSR.

(Mazur *et al.* 2023)

1.2.2 Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales (mAb) son utilizados como tratamiento profiláctico, desencadenando una inmunización pasiva y tienen una alta especificidad contra los antígenos.

El Palivizumab (PVM) es un anticuerpo monoclonal que fue desarrollado en un periodo de 10 años y fue aprobado por la FDA desde 1998, se obtuvo de un epítipo reconocido en la proteína F, la cual es una región que ha cambiado poco, por lo que sigue siendo efectivo. Debido a su elevado costo solo se administra a grupos de alto riesgo de infección por VSR como bebés prematuros o pacientes con enfermedad pulmonar crónica del prematuro (EPC) (Rodriguez-Fernandez *et al.* 2021).

Debido a la poca variación de la secuencia de la proteína F, la mayoría de los mAb contra VSR son IgG dirigidos contra epítipos virales de la proteína F y sus diferentes conformaciones (Pre-F y Post-F) (Tabla 3) (Rodriguez-Fernandez *et al.* 2021).

El mAb conocido como Nirsevimab que tiene el sitio de dirección Φ que se encuentra en la proteína de pre-fusión recientemente ha sido recomendado por la CDC para su administración en bebés menores de 8 meses nacidos durante la temporada de VSR; cuando la madre no ha recibido vacuna en el embarazo, no se sabe si la madre ha sido vacunada previamente o si el bebé nació antes de pasadas 2 semanas de la vacunación de la madre (Langedijk *et al.* 2022).

Tabla 3. Anticuerpos monoclonales contra VSR

Vida media	Anticuerpo monoclonal	Avance del estudio	Epítipo blanco
Estándar	Palivizumab	Aprobado y comercializado	Sitio antigénico II (Proteína Pre-F y Post-F)
	Motavizumab	No aprobado	Sitio antigénico II (Proteína Pre-F y Post-F)
	MPE 8	En estudio	Sitio antigénico IV (Proteína Pre-F) y hMPV
	TLR3D3	En estudio	Proteína G
Prolongada	Suptavumab (REGN-2222)	Estudio interrumpido	Sitio antigénico V (Proteína Pre-F)
	Motavizumab-YTE	Estudio interrumpido	Sitio antigénico II (Proteína Pre-F y Post-F)
	Nirsevimab	Aprobado	Sitio antigénico Φ (Proteína Pre-F)
	MK-1654	En estudio	Sitio antigénico IV (Proteína Pre-F y Post-F)

(Rodriguez-Fernandez *et al.* 2021)

1.3 Modelos de expresión de proteínas recombinantes

1.3.1 Expresión de proteínas en *Escherichia coli*

El uso de *Escherichia coli* como biorreactor fue de las primeras formas para producir proteínas recombinantes, en la actualidad sigue siendo el método más empujado debido a que su tecnología está bien consolidada, hay un catálogo extenso de vectores de expresión, una variedad de cepas diseñadas con fines específicos y su rentabilidad (Rosano and Ceccarelli, 2014).

Una de las ventajas que tiene *E. coli* en la producción de proteínas es su cinética de crecimiento la cual es acelerada en comparación con otros sistemas, se ha demostrado experimentalmente que inocular un cultivo con una dilución 1/100 de un pre-inóculo iniciador saturado en caldo Luria-Bertani (LB) puede alcanzar la fase estacionaria en pocas horas, que es la etapa en la que las bacterias han consumido todos los nutrientes del medio y donde alcanzarán su máximo crecimiento, ya que después comienzan a morir (Sezonov *et al.* 2007). Otra característica importante es que se pueden obtener cultivos de *E. coli* con alta densidad celular en medios simples como LB a 37 °C, por lo regular $<1 \times 10^{10}$ células viables/mL, también es un sistema económico y fácil de manejar ya que los medios necesarios para el crecimiento de *E. coli* son simples (Shiloach and Fass, 2005).

La disponibilidad de plásmidos de expresión en *E. coli* es amplia y existen dos tipos de vectores de expresión: los pGEX que inducen con IPTG directamente el gen que se encuentra río abajo del promotor y los pET que utilizan el IPTG para inducir la expresión de la ARN polimerasa del fago T7 que se encuentra bajo el promotor *lacUV5*, la cual

reconoce al promotor de T7 que dirige la expresión del gen de interés que se clonó. Ambos requieren la presencia de los siguientes elementos: origen de replicación, un promotor, etiquetas de afinidad, una secuencia codificante para remover la etiqueta, sitios múltiples de clonación, un terminador y marcadores de selección que comúnmente constan de elementos que confieren resistencia a diversos antibióticos (Rosano and Ceccarelli, 2014).

Las cepas de *E. coli* que existen son muy variadas y una de las más utilizadas generada en el laboratorio es la llamada BL21 ya que tiene una deficiencia de la proteasa Lon, la cual tiene como función degradar proteínas ajenas a la bacteria, además no está presente en su genoma el gen que codifica la proteasa de membrana externa OmpT, la cual digiere proteínas del medio extracelular, por lo que es conveniente su empleo para evitar la degradación de la proteína recombinante que se desea generar por dichas proteasas (Grodberg and Dunn, 1988).

1.3.2 Expresión transitoria de proteínas en plantas de tabaco

La obtención de proteínas heterólogas en sistemas vegetales es un proceso experimental que ha sido implementado para el desarrollo de nuevos biofármacos. Algunas de las empresas o grupos más destacados en biofarmacia usando esta plataforma son: Protalix Biotherapeutics, BioApp, KBio, Baiya Phytopharm, University of Louisville, Denka/Ikon genetics, InVitria, ORF Genetics, Diamante y Cape Bio Pharms.

A pesar de que existen diferentes formas de transformación de plantas, el sistema de expresión transitoria basado en vectores virales conocido como “Magnifection” que ha demostrado poder obtener concentraciones de hasta un 80 % de la proteína de interés,

del total de la proteína soluble a partir de un extracto de planta y sus tiempos de expresión son relativamente cortos ya que requieren de 3 a 7 días (Marillonnet *et al.* 2004).

La técnica de Magniffection es un sistema ecléctico que adiciona las ventajas de la capacidad de replicación de un virus de planta para producir una alta cantidad de la proteína de interés, además del uso de la bacteria *Agrobacterium* para transferir el ADN en la célula vegetal y el uso de plantas que tienen una biomasa abundante. Se usa una suspensión de provectores virales de ADN que se administran de manera sistémica a tejidos vegetales a través de *Agrobacterium tumefaciens* y vacío (Gleba *et al.* 2005). Usamos una cepa conocida como GV3101, la cual tiene un fondo genético C58 con resistencia a rifampicina y el plásmido pTIC58DT-DNA con resistencia a gentamicina, por lo que esta cepa se emplea para la formación de un sistema binario con ADN-T funcional, ya que la región ADN-T está eliminada del plásmido Ti y en su lugar contiene un plásmido de menor tamaño que contiene la región T faltante donde se introduce el gen de interés, por lo que permite transferir el material genético a la planta huésped.

El sistema necesita de tres módulos (Fig. 4); el módulo 3' (pICH7410 o pICH1599) basado en el virus TMV, el primero se utiliza para la expresión de GFP y el segundo es un vector de clonación para insertar el gen de interés, el módulo 5' (pICH21380) basado en el virus PVX que contiene la RdRp (ARN polimerasa dependiente de ARN) y la proteína de movimiento que permite el movimiento del replicón viral de una célula a otra y finalmente el módulo de la integrasa que propicia una recombinación de los 3 módulos para la producción de la proteína heteróloga (Giritch *et al.* 2006).

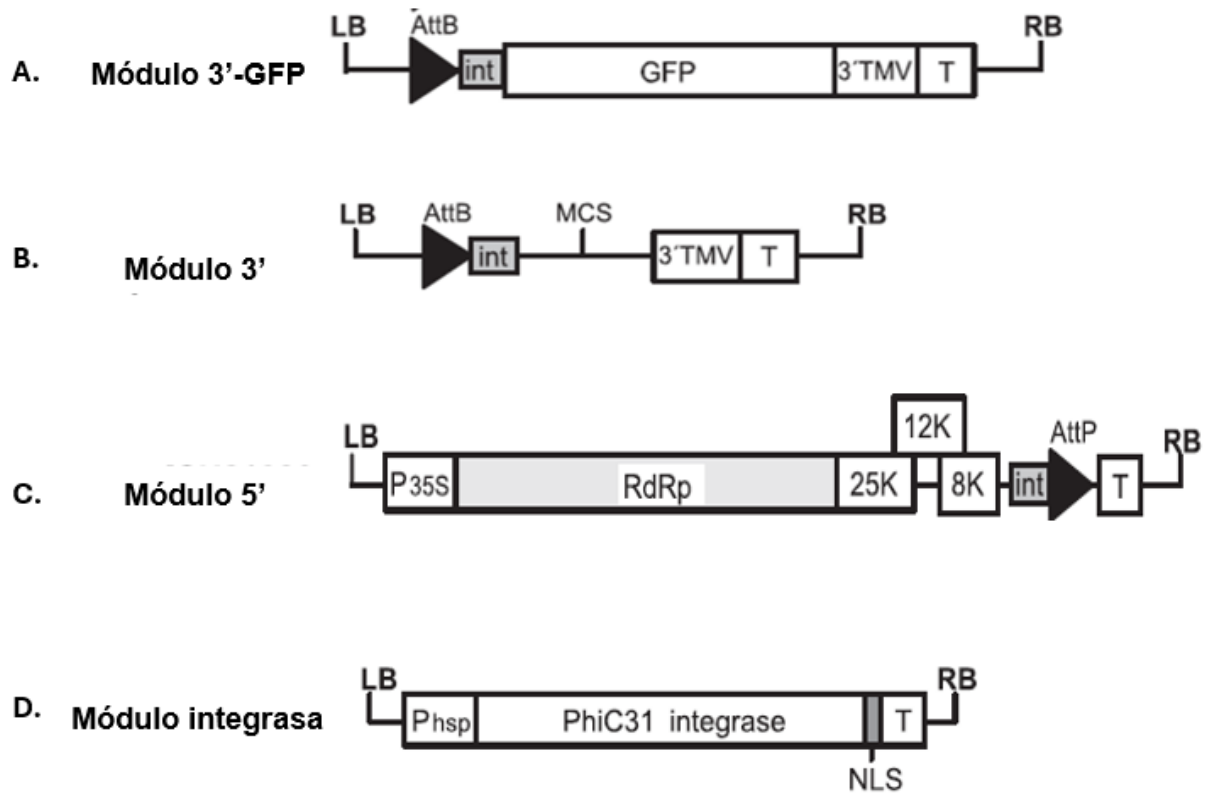


Figura 4. Vectores virales usados en el método de Magnifection. **A.** Módulo 3' con el gen que codifica para la proteína verde fluorescente GFP (pICH 7410). **B.** Módulo 3' vector de clonación donde se inserta gen de interés (pICH11599). **C.** Módulo 5' que contiene la ARN polimerasa dependiente de ARN y la proteína de movimiento (pICH21380). **D.** Módulo integrasa (pICH14011). Imagen modificada de (Giritch *et al.* 2006).

El proceso de ensamblaje *in planta* de los vectores virales consiste en la recombinación sitio específica con ayuda de la enzima integrasa que reconoce los sitios de recombinación del fago C31 de *Streptomyces* AttP y AttB presentes en los módulos 5' y 3' respectivamente, el ADN que se obtiene se transcribe y se empalma para eliminar los intrones como los sitios de recombinación y solo conservar los exones que son la parte de la secuencia que se va a transcribir en un replicón viral de ARN funcional que se va a traducir en la proteína de interés o infectará otras células de la planta (Fig. 5) (Marillonnet *et al.* 2004).

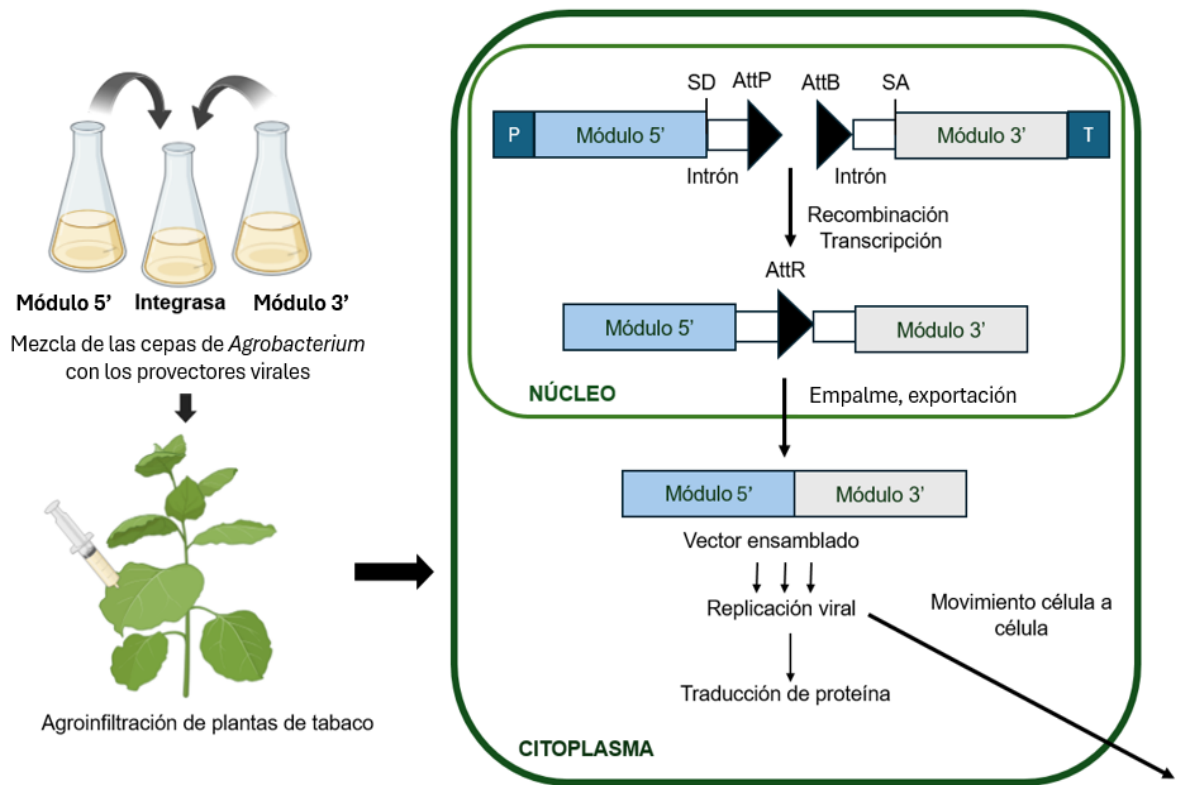


Figura 5. Esquema de ensamblaje in planta de los provectores virales. SD: sitio donador de empalme, SA. Sitio aceptor de empalme. Los 3 módulos previamente transformados en *Agrobacterium tumefaciens* se crecen en medio LB por separado y después se mezclan para agroinfiltrar las plantas de tabaco, la recombinación sitio-específica ocurre en el núcleo de la célula vegetal por medio de la enzima integrasa que integra a los sitios AttP y AttB generando el sitio AttR, también se realiza el empalme de la secuencia y después se exporta el replicón viral al citoplasma donde se traduce a proteína o sale de la célula para infectar a otras. Imagen modificada de (Marillonnet *et al.* 2004).

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Producir proteínas recombinantes contra el Virus Sincicial Respiratorio en dos modelos de expresión; *Escherichia coli* y plantas de tabaco, para su posterior extracción y purificación.

2.2 Objetivos específicos

- Diseñar un gen que codifique una proteína antigénica mejorada contra el VSR (PreFVac), que contenga regiones de cepas circulantes que sean conservadas, antigénicas, no alergénicas y con regiones adyuvantes que generen un balance en la respuesta inmunitaria Th1/Th2.
- Demostrar que mediante la recombinación *in vivo* de los 3 módulos de expresión viral usados en la técnica de Magniffection para transformación transitoria de plantas de tabaco es posible producir la proteína verde fluorescente “GFP”.
- Analizar por PCR la presencia del gen *BFVax* previamente diseñado en el grupo de laboratorio, en los stocks de glicerol almacenados a -80 °C de la construcción *BFVax*-pET28 b (+) en la cepa BL21 y de la construcción *BFVax*-pICH11599 en la cepa GV3101.
- Expresar, extraer y purificar las proteínas recombinantes BFVax y PreFVac en *E. coli*.
- Evaluar la producción de las proteínas recombinantes purificadas por el método de Bradford.

- Clonar el gen *PreFVac* en pICH11599 (módulo 3' de Magniffection) e incorporar a la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 por electroporación.
- Identificar por Western blot y dot blot la presencia de las proteínas BFVax y PreFVac obtenidas por el método de Magniffection.

3. Resultados

3.1 Diseño de gen sintético *PreFVac*.

Aunque en el laboratorio ya contábamos con un gen sintético *BFVax* basado en la proteína F, clonado en un vector de expresión bacteriano, se diseñó *in silico* un nuevo gen sintético llamado *PreFVac*, basados en información más reciente, con la intención de comparar los resultados de su inmunización en ratones. Este nuevo gen codifica una proteína recombinante contra el VSR que consta de regiones de la proteína de pre-fusión del VSR que son conservadas, antigénicas y no alérgicas (Tabla 4), también incluye etiquetas para su posterior purificación y regiones adyuvantes que teóricamente generan un balance de la respuesta Th1/Th2 (Fig. 6). La proteína recombinante consta de 244 aminoácidos y tiene un peso molecular de aproximadamente 26 kDa (Tabla 5). Además, se realizó el modelado de la proteína antigénica en ITASSER, en el cual se puede apreciar que consta de las estructuras hélice α y la hoja β plegada (Fig. 7).

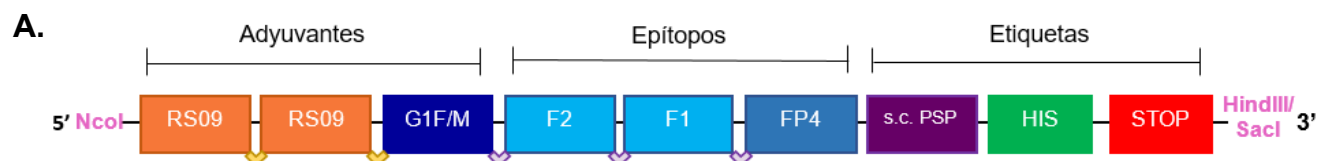
Tabla 4. Secuencias seleccionadas para el diseño de la proteína PreFVac.

Región antigénica	Posición de los aminoácidos	Secuencia de aminoácidos (número de a.a.)
G1F/M	Proteína G VSR: 125 – 225 Proteína F del sarampión: 113 -131 Proteína M del VSR: 81-95	TLQSTTVKTKNTTTTKIQPSKPTTKQRQNKPPNK PNNDFHFEVFNFVPCSISSNNPTCWAICKRIPNKK PGKKTITTKPTKKPTIKTTKKDLKPQTTPKEV (101) FAGVVLAGAALGVAAAAQI (19) ESYIGSINNITKQSA (15)
F2	Proteína F VSR: 64 – 79	IKENKCNNGTDAKVLI (16)
F1	Proteína F VSR: 196 - 222	KNYIDKQLLPILNKQSCSISNIETVIE (27)
FP4	Proteína F VSR: 49 - 63	RTGWYTSVITIELSN (15)

(Zeng *et al.* 2005 ; McLellan *et al.* 2013; Su *et al.* 2022)

Tabla 5. Resultados del análisis bioinformático de la proteína antigénica PreFVac.

Servidor	Resultado
VaxiJen v2.0	Probable antígeno
AllerTOP v.2.0	Probable no alergeno
ExPASy ProtParam	Nº de aminoácidos: 244 Peso molecular: 25,956.86 Da Punto isoeléctrico (pI) teórico: 9.87



Descripción de elementos de la proteína

RS09: Adyuvantes

NcoI/HindIII: Enzimas de restricción seleccionadas para cortar en Vector pET-28b(+)

NcoI/SacI: Enzimas de restricción seleccionadas para clonar en pICH11599

G1F/M: Proteína quimera que aporta balance Th1/Th2

F2: Secuencia de la región F2 de la proteína de pre-fusión de VSR

F1: Secuencia de la región F1 de la proteína de pre-fusión de VSR

FP4: Secuencia de la región F2 de la proteína de pre-fusión de VSR

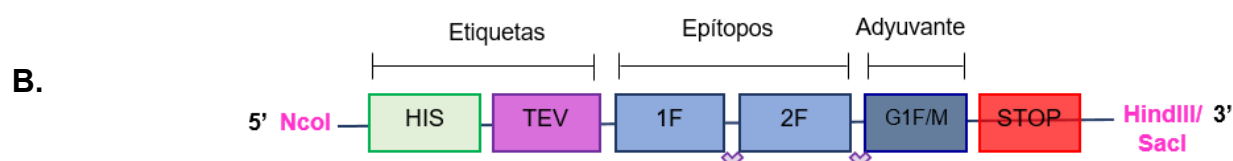
s.c. PSP: Sitio de corte de proteasa PSP (PreScission Protease)

HIS: Histidinas

STOP: Codón de paro

👉: Linker Glicinas (GGG)

👉: Linker Glicinas y Prolinas (GPGPG)



Descripción de elementos de la proteína

HIS: Histidinas

TEV: Sitio de corte de la proteasa Tobacco Etch Virus

NcoI/HindIII: Enzimas de restricción seleccionadas para clonar en Vector pET-28b(+)

NcoI/SacI: Enzimas de restricción seleccionadas para clonar en pICH11599

G1F/M: Proteína quimera que aporta balance Th1/Th2

F2: Región de la proteína F del VSR

F1: Región de la proteína F del VSR

STOP: Codón de paro

👉: Linker Glicinas y Prolinas (GPGPG)

Figura 6. Esquemas de la construcción de las proteínas PreFVac y BFVax.

A. Representación de PreFVac **B.** Representación de BFVax.

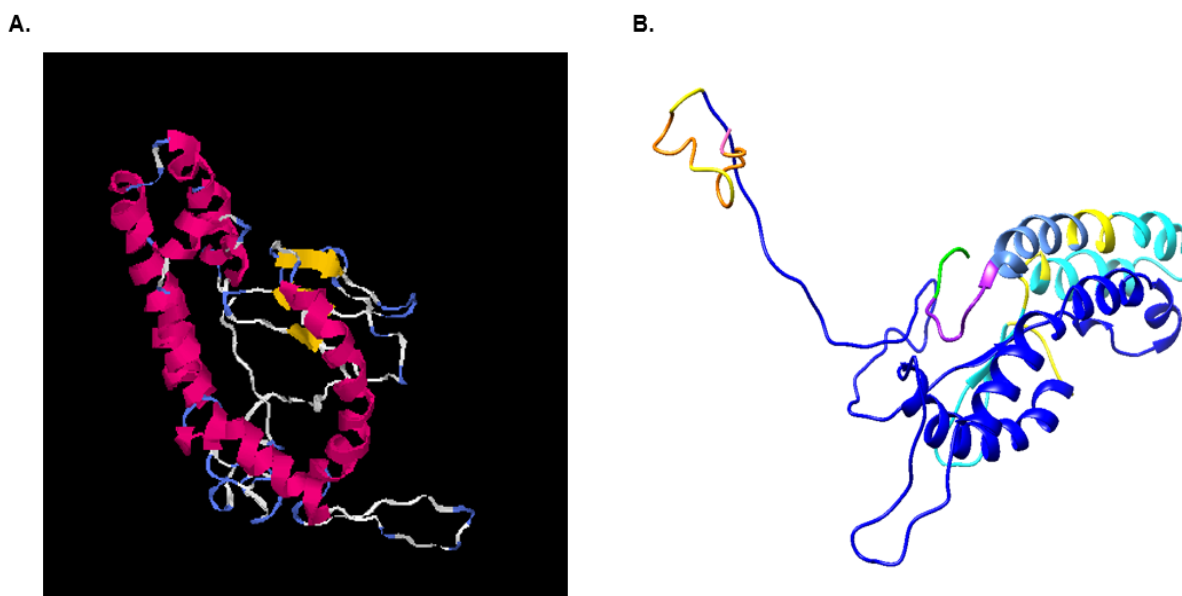


Figura 7. Modelado de la proteína PreFVac *in silico*.

A. Modelo obtenido en ITASSER, con C-score: -2.64 y TM-Score: 0.41 +/- 0.14.

B. Modelo de ITASSER editado en Chimera 1.16 simbología: RS09, G1F/M, F2, F1, FP4, s.c. PSP, 6xHis, Linkers.

3.2 Sistemas de expresión

3.2.1 *Escherichia coli*

3.2.1.1. Verificación de las construcciones de los genes *BFVax* y *PreFVax* en pET28 b (+).

El gen *BFVax* del stock de glicerol que contiene la construcción del gen *BFVax* en Pet28 b(+), transformado previamente en la cepa BL21 de *Escherichia coli* por choque térmico, se amplificó por PCR con los oligos específicos y dio un amplicon del tamaño esperado de 340 pb (Fig. 8) y para el gen *PreFVax* ya clonado en Pet28 b (+) por la empresa Genscript, primero se transformó por choque térmico en la cepa BL21 y para comprobar su presencia se realizó un perfil de restricción con las enzimas *NcoI/HindIII*, las cuales delimitan todos los segmentos que contiene la construcción del gen y se obtuvo una banda esperada de aproximadamente 744 pb (gen de interés) y otra de 5,240 pb (tamaño del vector) (Fig. 9), lo que comprueba que las construcciones son correctas y por ende están listas para inducir las con IPTG y producir la proteína recombinante.

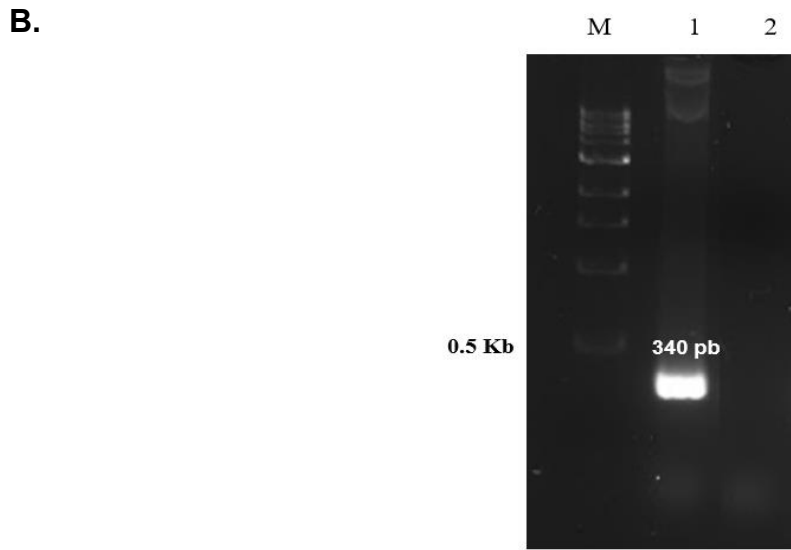
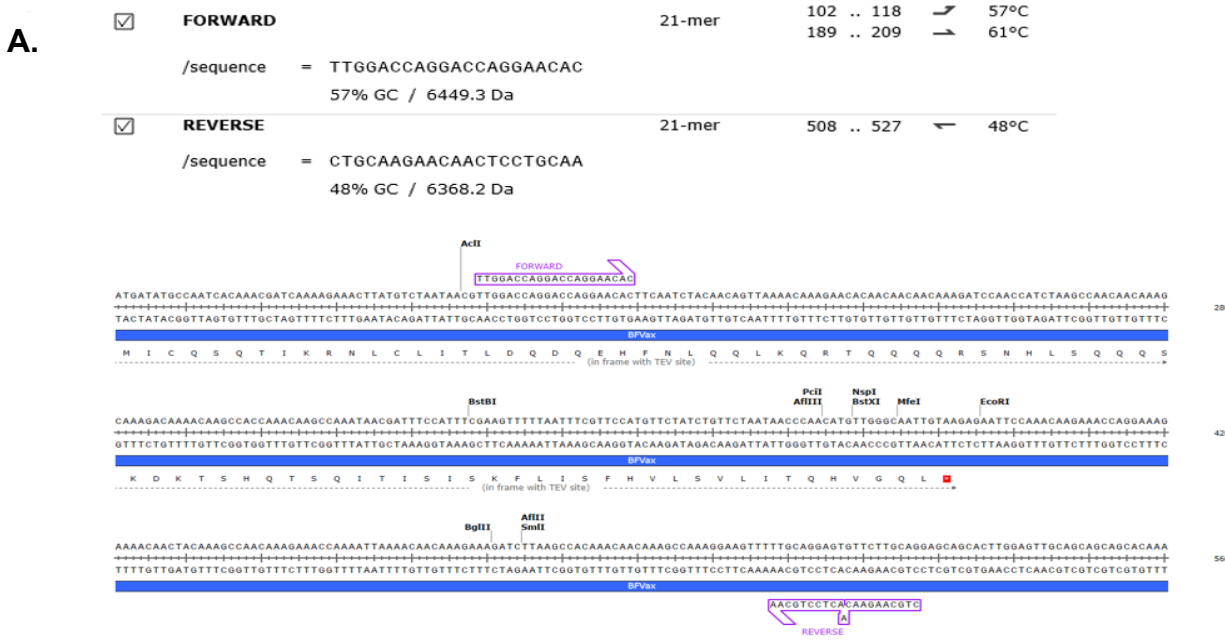


Figura 8. Productos de PCR de la construcción del gen *BFVax*-Pet28b (+). **A.** Oligos forward y reverse alineados en la secuencia del gen *BFVax*. **B.** Visualización en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, carril M: marcador de peso molecular de 1 Kb de BioLabs, carril 1 amplicon resultante de la PCR de aproximadamente 340 pb; 2, control negativo.

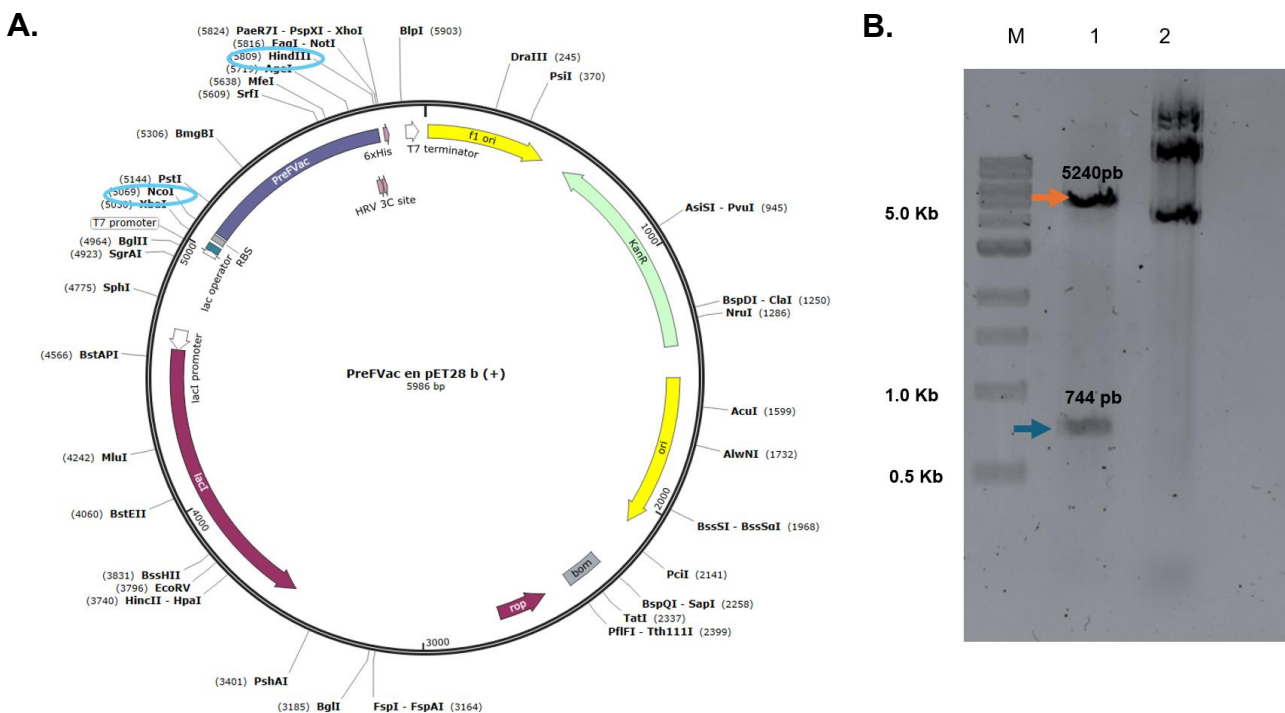


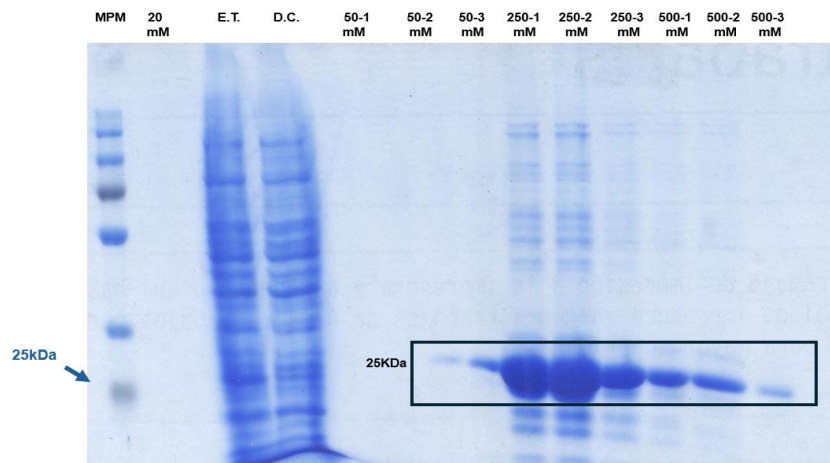
Figura 9. Perfil de restricción de la construcción del gen *PreFVac*-pET28 b (+).

A. Mapa de *PreFVac*-pET28 b(+) simulado en Snapgene, en óvalo azul se indican los sitios de corte. **B.** Visualización de gel de agarosa al 1% de la digestión con enzimas de restricción *NcoI/HindIII* que libera al fragmento del gen *PreFVac* de pET28 b (+), carril M: marcador de peso molecular de 1 Kb BioLabs carriles 1, muestra digerida, se aprecia una banda de aproximadamente 744 pb (gen de interés) y otra más arriba de aproximadamente 5,240 pb (vector); 2, plásmido no digerido.

3.2.1.2 Purificación de proteínas recombinantes BFVax y PreFVac

Inicialmente probamos varias condiciones para purificar por afinidad a níquel ambas proteínas recombinantes, tanto de la fracción soluble como la insoluble. En la sección 5.2.1.2 de metodología se detallan los pasos de la extracción de las 2 fracciones. Debido a que los mejores resultados se vieron con la fracción insoluble, solo presento estos resultados. Utilizamos diferentes concentraciones de imidazol que es un compuesto que compite con la histidina (etiqueta presente en las construcciones de las proteínas recombinantes) por unirse al níquel; se pudieron recolectar las proteínas de interés (se colectaron 3 fracciones con cada concentración), la mejor elución de la proteína fue a una concentración de imidazol 500 mM ya que para ambas proteínas es donde se aprecia la banda esperada de un tamaño de 25 kDa para la proteína BFVax y de 26 kDa para la proteína PreFVac con la menor cantidad de inespecificidades, ya que en las eluciones de imidazol 50 y 250 mM se pueden apreciar otras proteínas inespecíficas que se eluyen al pasar por columna (Fig. 10).

A.



B.

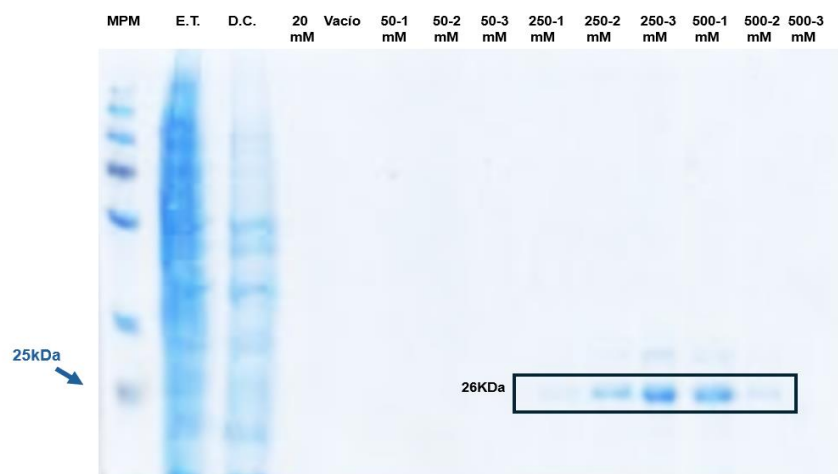
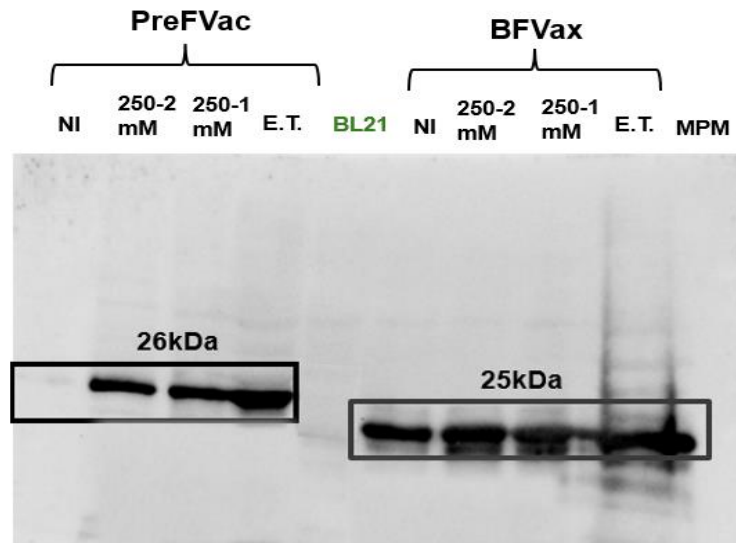


Figura 10. Geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie de muestras purificadas de las proteínas BFVax y PreFvac producidas en *E. coli*. En los recuadros negros se aprecia la proteína recombinante esperada, MPM: Marcador de peso molecular Page Ruler, E.T.: Extracto de proteína insoluble total, D.C.: Extracto de proteína insoluble total después de pasarlo por columna con resina de níquel, los demás carriles muestran las eluciones a diferentes concentraciones de imidazol, los números 1, 2 y 3 al lado de cada concentración, significan la primera, segunda y tercera elución respectivamente a esa misma concentración. **A.** Resultado de la purificación de la proteína BFVax **B.** Resultado de la purificación de la proteína PreFvac.

3.2.1.3 Identificación de las proteínas recombinantes BFVax y PreFVac.

La identificación de las proteínas observadas en los geles de SDS-PAGE se confirmó realizando la técnica de Western blot. Se usó la anti-histidina como anticuerpo primario y el anti-HRP (anti-Horseradish peroxidase) como anticuerpo secundario, revelando por quimioluminiscencia con peroxidasa; se obtuvo señal de las proteínas a un peso aproximado de 25 kDa que es lo esperado, la proteína PreFVac se aprecia por arriba del tamaño de la proteína BFVax debido a que pesa 26 kDa. También se usó el método colorimétrico usando anti-F de VSR como anticuerpo primario y anti-fosfatasa alcalina como anticuerpo secundario, se reveló con sustrato para la fosfatasa alcalina y como resultado se apreciaron bandas de color morado a la altura de aproximadamente 25 kDa que se aproxima al tamaño teórico esperado de las proteínas de interés (Fig. 11).

A.



B.

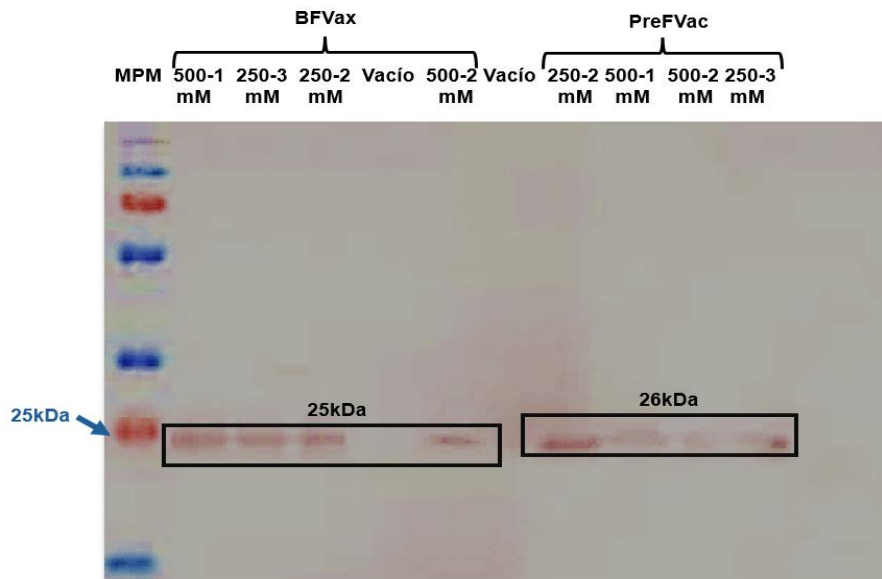


Figura 11. Western blot de las proteínas purificadas producidas en *E. coli*.

MPM: Marcador de peso molecular page ruler de 250 kDa, NI: Extracción de proteína en *E. coli* sin IPTG, E.T.: Extracto de proteína insoluble total, BL21: Extracto proteína insoluble total producida de la cepa de *E. coli* BL21 (Control negativo). Los carriles marcados con concentraciones corresponden a las eluciones con imidazol, los números 1, 2 y 3 a lado de cada concentración, es la primera, segunda y tercera elución respectivamente realizada en esa misma concentración. **A.** Revelado por método quimioluminiscente. **B.** Revelado por método colorimétrico.

3.2.1.4 Cuantificación por el método de Bradford de proteína insoluble total en las muestras purificadas de BFVax y PreFvac.

De los resultados obtenidos de la lectura de absorbancia de la curva de BSA se conservaron los obtenidos a los 10 minutos de lectura ya que después las absorbancias obtenidas permanecieron igual o comenzaron a disminuir (Tabla 6).

Tabla 6. Promedio de las absorbancias obtenidas a 595 nm de la curva de BSA.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Abs 595 nm
500	1.03
250	0.70
125	0.50
62.5	0.37
31.25	0.32
15.65	0.29
7.81	0.28
3.9	0.27

Se obtuvo la ecuación de la recta (Fig. 12) con los datos de la Tabla 6, para interpolar la absorbancia obtenida de las proteínas recombinantes con una concentración en específico. La cuantificación de la cantidad de proteína total de BFVax y PreFvac en *E. coli* después de concentrar, desalar y diluir cada una en PBS, fue de 24.31 $\mu\text{g/mL}$ y 292.13 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

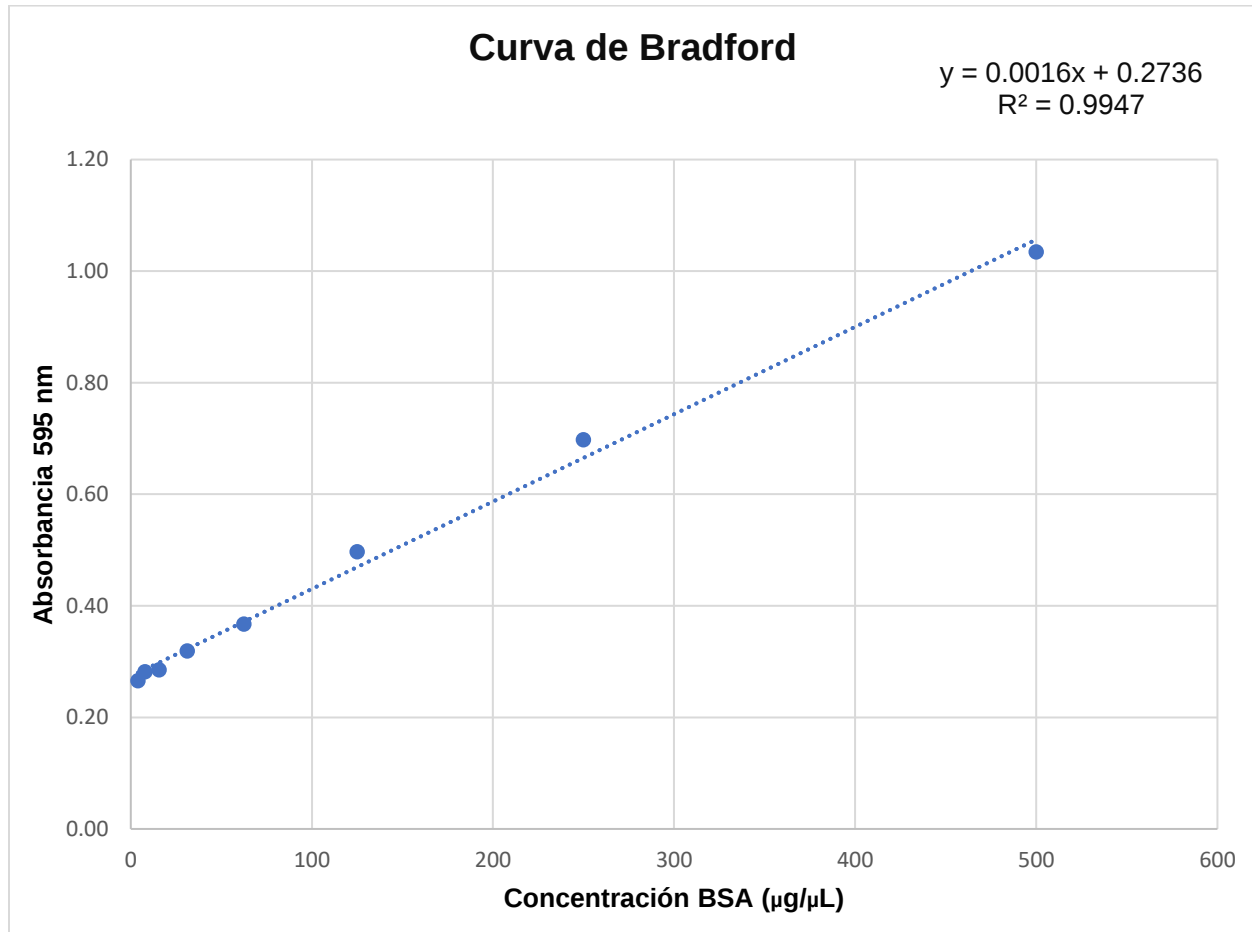


Figura 12. Curva de Bradford. Gráfico representativo de los datos de concentración de BSA vs. absorbancia para obtener la ecuación de la recta.

3.2.2 Plantas de tabaco

3.2.2.1 Estandarización de la técnica de “Magnifection”

Se usaron los módulos 5', integrasa y 3' que contiene el gen *GFP*, que están resguardados en stock de glicerol a -80°C, previamente transformados por electroporación en la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*, y se observa que son viables para producir proteínas heterólogas ya que con ayuda de un microscopio de fluorescencia bajo luz UV, a los 5 días post infección (dpi) de plantas de tabaco, se logran ver algunas manchas verdes, a los 8 dpi la hoja está completamente verde fluorescente y a los 11 dpi disminuye la expresión, a diferencia del control negativo (planta silvestre) que se observa la hoja totalmente de color rojo (Fig. 13).

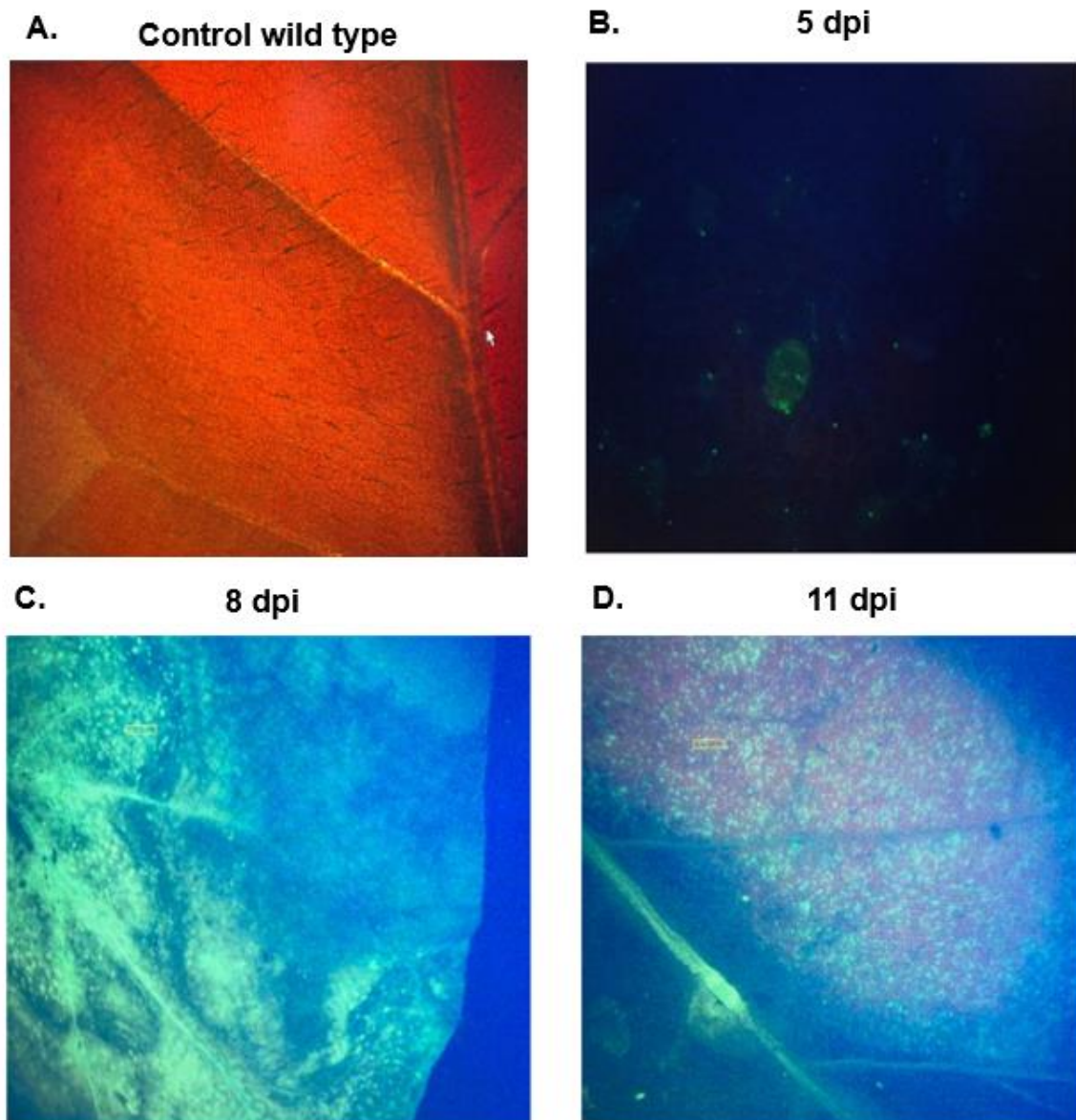
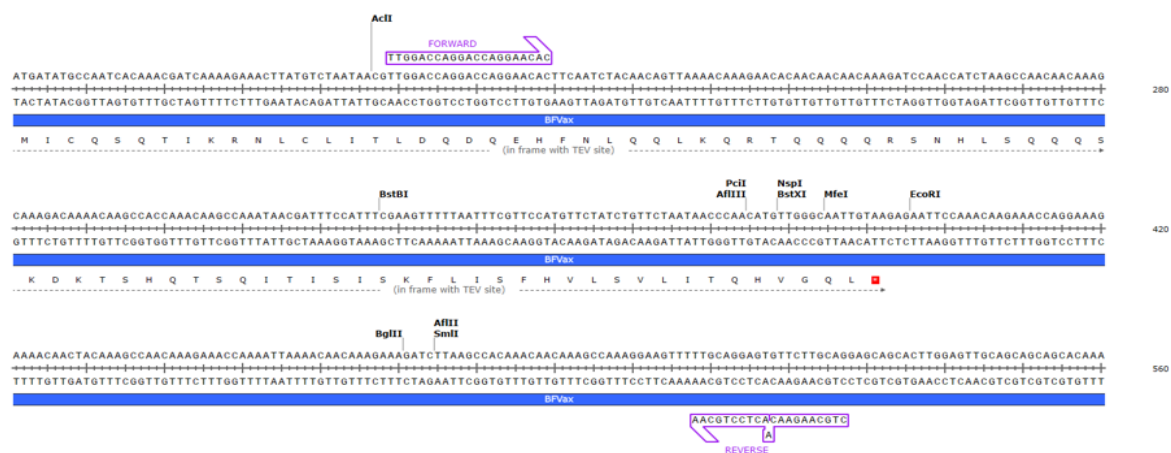


Figura 13. Expresión de GFP por método de “Magniffection”. Imágenes visualizadas en el microscopio de fluorescencia de las hojas de plantas de *Nicotiana tabacum* (sin nicotina) agro-infiltradas con el gen GFP. A. Wild type (control negativo) B. 5 dpi. C. 8 dpi. D. 11 dpi.

3.2.2.2 Construcciones de *BFVax* y *PreFVac* clonados en pICH11599

El resultado de la PCR fue un amplicón de 340 pb del *BFVax* (Fig. 14). En lo que respecta la clonación del gen *PreFVac* en pICH11599 se comprobó con la digestión de la construcción con *NcoI/HindIII*, donde se obtienen dos fragmentos: uno de 744 pb (gen de interés) y el otro de 6,425 pb (módulo 3'), además se realizó una PCR con oligos específicos que producen un amplicón esperado de aproximadamente 516 pb (Fig. 15). Se verificó que el *BFVax* se encuentra en el módulo 3' transformado en GV3101 y el gen *PreFVac* se logró clonar en pICH11599 y verificar su secuencia (Fig. 16).

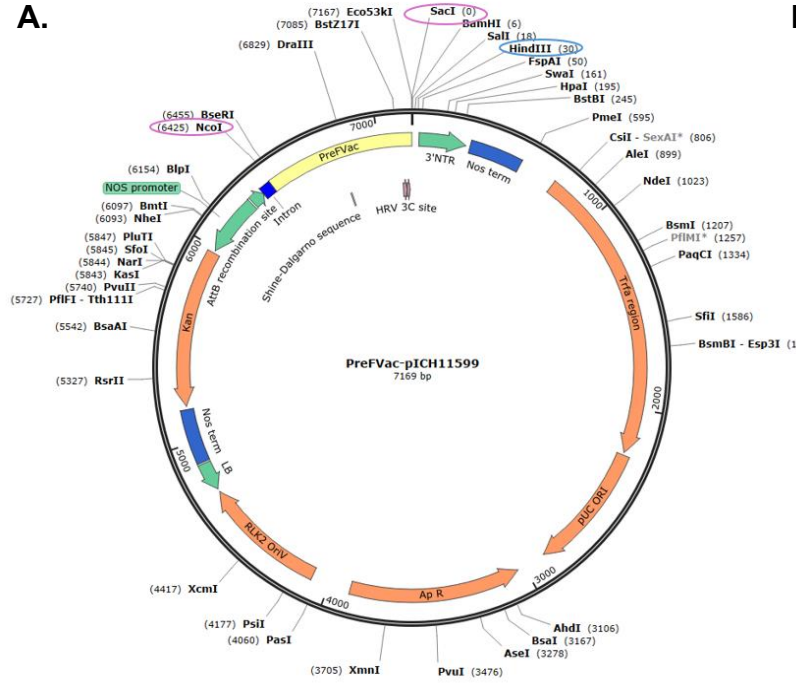
☒	FORWARD	21-mer	102 .. 118 189 .. 209	 	57°C 61°C
	/sequence = TTGGACCAGGACCAGGAACAC 57% GC / 6449.3 Da				
☒	REVERSE	21-mer	508 .. 527		48°C
	/sequence = CTGCAAGAACAACCTCCTGCAA 48% GC / 6368.2 Da				



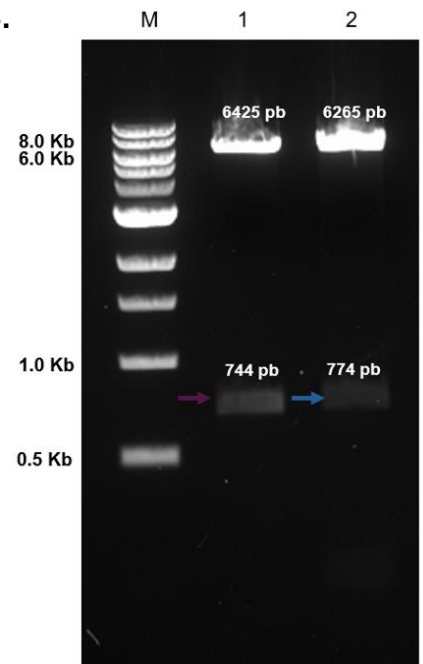
Agarose gel electrophoresis image showing PCR products. Lane M contains a DNA ladder with a 1.0 Kb marker indicated. Lane 1 shows a single band at 340 pb. Lane 2 shows a single band at 340 pb.

30

A.



B.



C.

☒ **FORWARD** 24-mer 6579 .. 6602 → 55°C
 /sequence = CAAACCTCCCAATAAGCCAAATAA
 38% GC / 7251.8 Da

☒ **REVERSE** 24-mer 7071 .. 7094 ← 60°C
 /sequence = ACGGAAGTATACCAACCAAGTACGT
 46% GC / 7354.9 Da

FORWARD
 CAAACCTCCCAATAAGCCAAATAA

AGACAAAACAAACCTCCCAATAAGCCAAATAATGATTTCATTTTGAAGTTTTCAATTTTGTTCCTTGTTCATTGTTCAAACAATCCT
 TCTGTTTTGTTTGGAGGGTTATTTCGGTTTATTACTAAAGTAAACCTTCAAAGTTAAACAAGGAACAAGGTAACAAGTTTGTAGGA 6660
 PreFVac

ACTTGTGTGGCGGATTTGCAAGAGGATTCCAACAAGAAGCCCGGAAGAAAACAACGACTAAACCCACCAAAAAACCTACTATCAAGACA
 TGAACAACCGCTAAACGTTCTCCTAAGGTTTGTCTTCGGGCTTTCTTTTGTGCTGATTGGGTGGTTTTTGGATGATAGTTCTGT 6750
 PreFVac

ACTAAGAAGGATTTGAAACCTCAGACAATAAGCCTAAGGAGGTTTTTGTCTGGTGTAGTTCTGGCTGGAGCAGCACTTGGTGTAGCTGCT
 TGATTCCTCCTAAACTTTGGAGTCTGTTGATTTCGGATTCTCCAAAAACGACCATCAAGACCGACCTCGTCTGAACCATCGACGA 6840
 PreFVac

GCAGCCCAATAGAAAGCTATATTGGGTCAATAAACAACATCACAACAATCTGCTGGCCAGGTCGGGTATCAAAGAAAATAAATGC
 CGTCGGGTTTATCTTCGATATAACCCAGTTATTGTTGTAGTGTTTGTAGACGACCGGGTCCAGGCCCATAGTTTCTTTTATTACG 6930
 PreFVac

AACGGAACTGATGCAAAAGTTAACTAATAGGGCCGGGACCGGGGAAAAATTACATAGACAAGCAGCTTCTCCCATCTTAACAAACAG
 TTGCCCTGACTACGTTTTCAATTTGATTATCCGGCCCTGGCCCTTTTAAATGTATCTGTTCTGCGAAGAGGGGTAAAGATTGTTTGTG 7020
 PreFVac

AGTTGTTCAATTTCAAATATTGAAACCGTCATTGAAGGCCCGGGCCCTGGACGTACTGGTTGGTATCTTCCGTCATACTATTGAGCTG
 TCAACAAGTTAAAGTTTAACTTTGGCAGTAACCTCCGGGGCCGGGACCTGCATGACCAACCATATGAAGCGAGTATTGATAACTCGAC 7110
 PreFVac

BstZ17I
 TGCATGACCAACCATATGAAGGCA
REVERSE

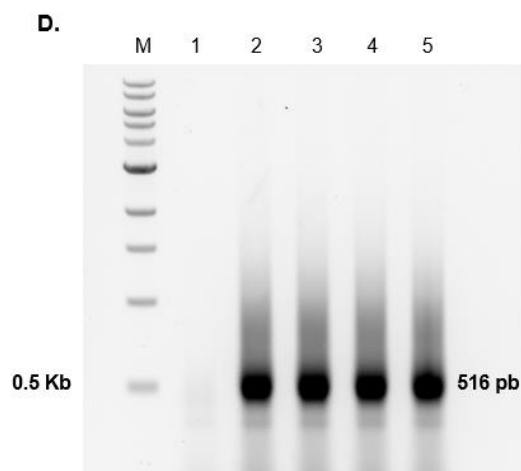


Figura 15. Perfil de restricción y productos de PCR de la construcción del gen *PreFVac-pICH11599* **A.** Mapa de *PreFVac-pICH11599* simulado en Snapgene, en óvalos morados (*NcoI/SacI*) y en óvalo azul (*HindIII*) se indican los sitios de corte. **B.** Visualización de gel de agarosa al 1% de la digestión con enzimas de restricción, carril M: marcador de peso molecular de 1 Kb BioLabs, carriles 1, muestra digerida con *NcoI/SacI*, se aprecia una banda de aproximadamente 744 pb (gen de interés) y otra más arriba de aproximadamente 6,425 pb (vector); 2, digestión con *NcoI/HindIII*, se aprecia una banda de 774 pb (gen de interés con nucleótidos extra) y otra de aproximadamente 6,265 pb que es lo que resta del vector. **C.** Oligos forward y reverse alineados en la secuencia del gen *PreFVac*. **D.** Visualización en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, carril M: marcador de peso molecular de 1 Kb de BioLabs, carril 1; control negativo, carriles 2,3,4,5; amplicón resultante de la PCR de aproximadamente 516 pb con los oligos mencionados en la Tabla 10.

3.2.2.3 Detección de las proteínas BFVax y PreFVac producidas en plantas de tabaco por el método de “Magniffection”

El Western blot para detectar las proteínas BFVax y PreFVac fue realizado con anti-histidina como anticuerpo primario y anti-fosfatasa alcalina como anticuerpo secundario, revelado por el método colorimétrico con un sustrato específico, en el cual se puede apreciar una banda esperada de 25 kDa y otra de 26 kDa respectivamente (Fig. 17). En lo que respecta la identificación de la proteína PreFVac también se realizó un dot blot por el método quimioluminiscente usando anti-histidina como anticuerpo primario y anti-HRP como anticuerpo secundario revelando con peroxidasa, donde se obtuvo una señal, confirmando la presencia de la proteína de interés (Fig. 18).

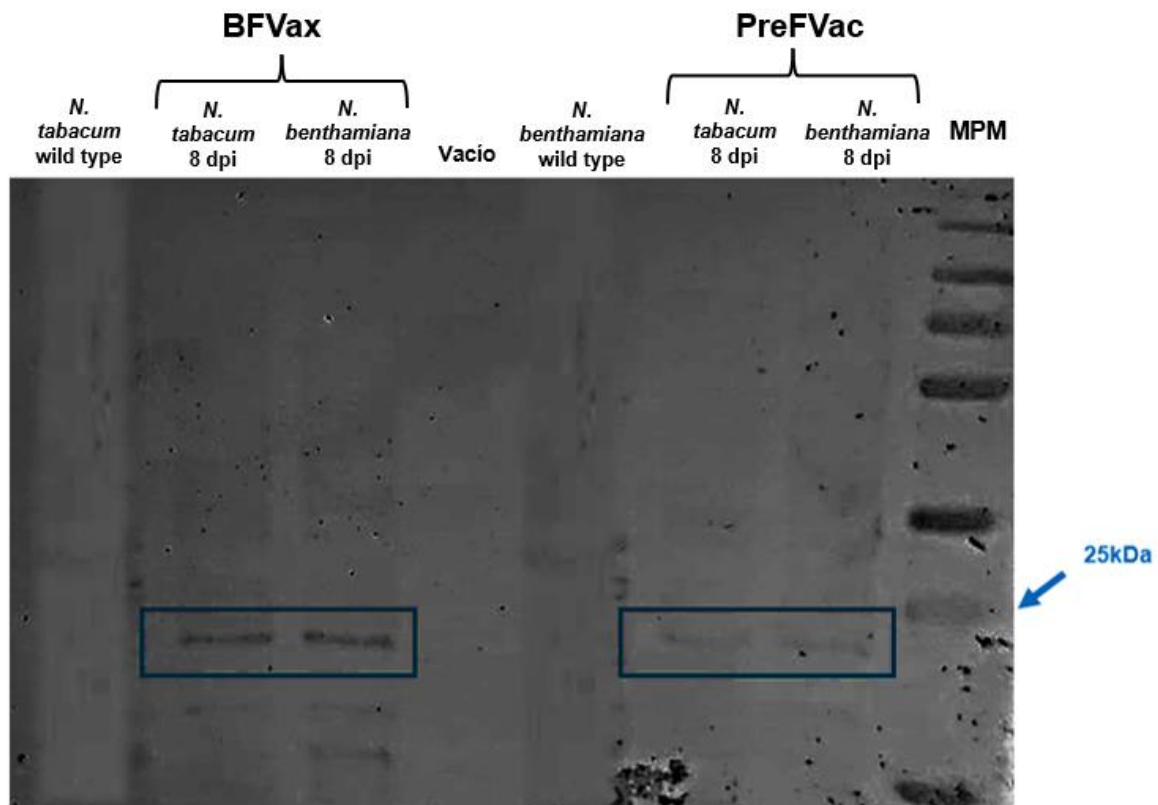


Figura 17. Western blot de extracción de la proteína BFVax y PreFVac en plantas de tabaco. Revelado por método colorimétrico. MPM, Marcador de peso molecular (Page Ruler) de 250 kDa.

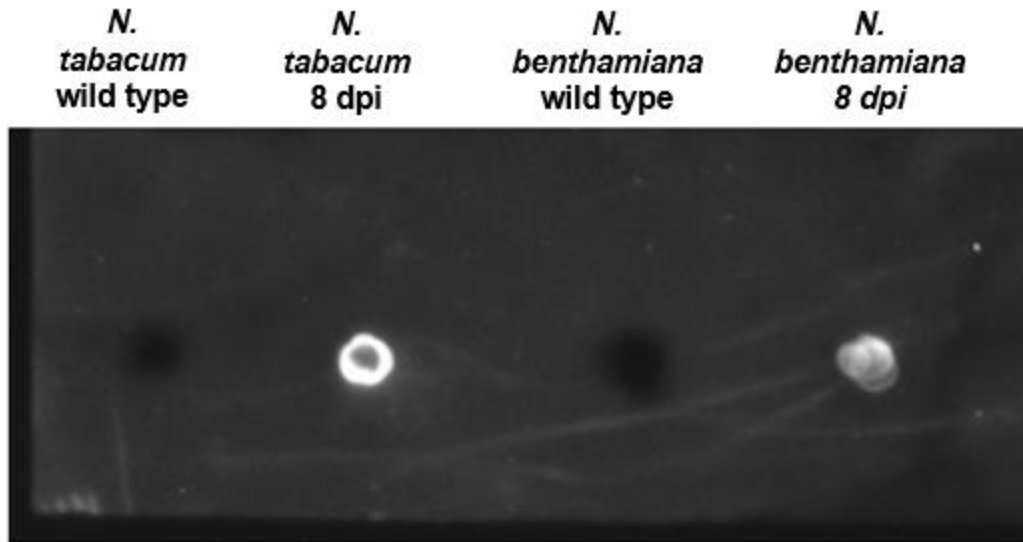


Figura 18. Dot blot de extracción de la proteína PreFVac en plantas de tabaco.
Revelado por método quimioluminiscente.

4. Discusión

El VSR es un agente etiológico que afecta al tracto respiratorio bajo, y es la primera causa de bronquiolitis que produce la tercera parte de neumonías en el mundo. Este virus es de importancia clínica ya que genera alto número de muertes y hospitalizaciones al año tanto de niños menores a 5 años como personas mayores a 60 años y se estima que los países de medios y bajos ingresos el VSR supera los 3 millones de dólares en costos médicos (Mazur *et al.* 2023). Por lo anterior, es imprescindible contar con una vacuna que prevenga la enfermedad por VSR. Aunque en 2023 la FDA aprobó las vacunas Arexvy de GSK y Abrysvo de Pfizer ambas para adultos mayores de 60 años y la última también está recomendada en mujeres embarazadas (CDC, 2023), desafortunadamente no es de fácil acceso para países de medios y bajos ingresos.

Los estudios recientes en proceso para la generación de una vacuna contra VSR, se basan en diferentes tecnologías como las vacunas basadas en partículas (VLPs), vectores recombinantes, quiméricas, virus vivos atenuados (LAV), y mRNA entre otras, pero la que más auge ha tenido y en la que se basan las nuevas vacunas contra VSR, son las vacunas de subunidades que están basadas en proteínas, de las cuales su población objetivo son los adultos mayores y mujeres embarazadas (Mazur *et al.* 2023). Por otro lado, hubo un incidente en los 60s de la vacuna contra VSR basada en la inactivación del virus con formaldehído (Kim *et al.* 1969), que provocó una enfermedad exacerbada por VSR en los niños vacunados, ya que se produjo un desequilibrio en la respuesta Th1/Th2 con un sesgo hacia la respuesta Th2 (Knudson *et al.* 2015), por lo que hay que poner especial atención en mantener el balance de la respuesta inmunitaria.

La proteína de fusión F ha sido la más estudiada para generar vacunas ya que tiene poca variabilidad genética (5%) comparada con otras proteínas externas del virus, y es importante mencionar que en estudios recientes se ha demostrado que las conformaciones de pre fusión y post fusión, tienen sitios antigénicos con una alta potencia de neutralización, en especial el sitio Φ de la proteína de pre fusión (McLellan *et al.* 2013). En este trabajo se diseñó *in silico* una proteína recombinante PreFVac que contiene epítomos del mencionado sitio antigénico, además, consta de regiones adyuvantes como la proteína quimera G1F/M que se ha indicado proporciona un balance en la respuesta Th1/Th2 (Zeng *et al.* 2005) y dos moléculas de RS09, la cual es un péptido mimético al lipopolisacárido (LPS) presente en la pared celular de las células Gram negativas, que logra producir una inflamación sistémica al relacionarse con el TLR-4, por lo tanto mejora la inmunogenicidad de la vacuna (Shanmugam *et al.* 2012). Por dichas razones la proteína PreFVac se proclama como mejorada en comparación de la proteína BFVax con la que se contaba anteriormente en el grupo ya que a pesar de que también contiene la proteína quimera G1F/M, prescinde del adyuvante RS09 y contiene epítomos de la proteína de fusión, claro que esta inferencia deberá probarse en ratones posteriormente. Ambas proteínas pudieron purificarse por cromatografía de afinidad al níquel en columna, ya que se ha demostrado es una forma rápida y efectiva para poder obtener las proteínas recombinantes de interés (Javanshad *et al.* 2023).

4.1 Producción de BFVax y PreFVac en *E. coli*

En lo que respecta los modelos de expresión para producir proteínas recombinantes se seleccionó en primer lugar a *Escherichia coli*, por ser el sistema más utilizado, su rapidez de crecimiento y tecnología bien dilucidada (Rosano y Ceccarelli 2014). Los genes

sintéticos se expresaron en el vector pET28 b (+) transformados por choque térmico en la cepa de *Escherichia coli* BL21, esta cepa fue seleccionada por la falta de proteasas, que suelen ser un inconveniente ya que pueden desintegrar la proteína de interés. Para inducir la producción de BFVax y PreFVac, se empleó 1mM de IPTG, que nos dio como resultado de forma cualitativa una buena cantidad de expresión (Fig. 10), los buffers utilizados para la extracción de proteína recombinante fueron tres, el primero que contenía sales para lisar las células de *E. coli*, otro igualmente con sales pero con la adición de tritónX100 que es un detergente que nos ayudaría a eliminar inespecificidades y finalmente el que contenía cloruro de guanidina y HCl que era necesario para obtener las proteínas contenidas en la fracción insoluble de la extracción bacteriana. Los resultados obtenidos en la identificación de las proteínas (Fig. 11) nos mostraron que ambas se encontraban en la fracción insoluble y esto se correlaciona con lo que está reportado en la bibliografía, ya que *Escherichia coli* tiende a formar proteínas con un alto nivel de agregación, lo que es conocido como cuerpos de inclusión que son insolubles (Palmer y Wingfield 2004). Además de los buffers, es necesario someter a las muestras a una centrifugación a baja velocidad para separar la fase soluble e insoluble y hacer empleo de lisis mecánica de la bacteria por sonicación, para obtener los mejores resultados de extracción. Finalmente se purificaron las proteínas por cromatografía de afinidad al níquel, donde las proteínas con histidina se unen a dicho elemento y se eluyen todas las que carecen esa etiqueta de 6 histidinas. Para obtener la fracción purificada de la proteína se emplean diferentes concentraciones de imidazol que compite con la histidina por la unión al níquel, es necesario usar hasta una concentración de 500 mM de imidazol para obtener las proteínas puras y sin inespecificidades.

Finalmente requerimos concentrar las proteínas purificadas y quitarles las sales (del imidazol y buffers empleados), para esto se usaron filtros centrífugos Amicon de 0.5 mL y después por el método de Bradford se evaluó la cantidad de proteína obtenida en $\mu\text{g/mL}$, los resultados obtenidos para PreFVac son de 292 y para BFVax de 24, sin embargo, esta última no concuerda con la apreciación cualitativa del gel SDS-PAGE teñido con Coomassie (Fig. 10 A.) donde la banda se ve fuertemente concentrada, si se compara con la de la PreFVac (Fig. 10 B.), por lo que se cree que la proteína BFVax se ha degradado o debido a que el filtro AMICON tiene una membrana de celulosa que puede estar filtrando a la proteína y no concentrándola, por lo que es necesario el uso de otro método para obtener BFVax concentrada y desalada.

A pesar de que ambas proteínas han sido diseñadas con programas bioinformáticos que predijeron la antigenicidad de las construcciones, es necesario probar las proteínas inmunizando ratones de la cepa BALB/c que demostrara si BFVax y PreFVac activan el sistema inmune induciendo la producción de anticuerpos y cual lo hace en mejor manera.

4.2 Producción de BFVax y PreFVac en plantas de tabaco por el método de Magniffection

La expresión de proteínas recombinantes en plantas ha tenido relevancia en los últimos años, ya que en la actualidad existen biofármacos producidos en material vegetal como Eleyso para tratamiento de la enfermedad de Gaucher producido por Protalix biotherapeutics. También hay investigaciones para el desarrollo de vacunas por esta tecnología, un ejemplo es la empresa BAIYAPhytopharm en Tailandia, que produjeron un prototipo de vacuna contra el SARS-CoV-2 en plantas basada en la secuencia de del virus aislado de Wuhan y también lo hizo la empresa MedicaGo en Canadá.

Una de las ventajas de producir proteínas en plantas sobre la producción en *E. coli* es que son un sistema eucariota por lo que tienen la capacidad de procesar proteínas complejas, además que son seguras y viables para emplearlas en la vacunación oral (Lugade *et al.* 2010).

Los sistemas que existen para producir proteínas recombinantes en plantas son los de transformación estable del genoma nuclear o de cloroplastos y la transformación transitoria, sin embargo, la primera ha tenido bajos rendimientos y es un proceso largo. Por otro lado, existe el método llamado Magniffection que emplea provectores virales contenidos en agrobacterias para producir proteínas heterólogas de forma transitoria, del cual se ha reportado que se necesitan solamente de 3 a 4 días para producir la proteína deseada y que hay rendimientos de hasta un 80% de proteína soluble total (Marillonnet *et al.* 2004). En nuestro trabajo usando esta metodología en tabaco, detectamos por fluorescencia la producción de la proteína verde fluorescente GFP (Fig. 13), donde observamos que a los 5 dpi empieza a observarse GFP, a los 8 dpi alcanza su máxima expresión y finalmente a los 11 dpi disminuye. La bacteria *Agrobacterium tumefaciens* entrega replicones virales a múltiples áreas de la planta, las agrobacterias realizan las funciones de infección primaria y movimiento sistémico y los vectores virales otorgan la propagación, amplificación y expresión de la proteína (Giritch *et al.* 2006), por eso es que al transcurrir los días hay una lisis de las células vegetales y por lo tanto disminución de la cantidad de proteína detectada.

De acuerdo con lo anterior se determinó que el mejor día para extraer la mayor cantidad de proteína recombinante es a los 8 dpi. En los resultados obtenidos se detectaron BFVax y PreFVax, es decir que se expresaron exitosamente por el método de Magniffection, sin

embargo, de forma cualitativa se puede apreciar que la cantidad de proteína obtenida es baja (Fig. 16), por lo que es necesario mejorar la extracción para después proceder a la purificación.

El gen *PreFVac* fue subclonado en el módulo 3' (pICH11599) y el perfil de restricción obtenido comprueba la inserción del gen, además que se detecta un amplicón esperado por medio de productos de PCR con oligos específicos y posteriormente se detectó la presencia de proteína por Western blot (Fig. 17) y dot blot (Fig. 18).

5. Conclusiones

- 1.- El uso de herramientas bioinformáticas permite diseñar una proteína recombinante con regiones del VSR conservadas, antigénicas y no alérgicas.
- 2.- Es posible expresar, extraer y purificar las proteínas recombinantes BFVax y PreFVac en el sistema de expresión de *E. coli*.
- 3.- Las proteínas de interés producidas en bacterias se eluyen mejor a una concentración de imidazol 500 mM, debido a que no se aprecian inespecificidades como a concentraciones menores.
- 4.- Concentrar, desalar y diluir las proteínas recombinantes por medio de filtros centrífugos Amicon Ultra de 0.5 mL se considera buena opción para la proteína PreFVac, sin embargo, para la proteína BFVax es necesario emplear otro método ya que se concluye que hay pérdida de proteína, debido a que el resultado obtenido no concuerda con lo que se apreciaba cualitativamente en el gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie antes de pasar la proteína por el filtro.
- 5.- Es posible expresar proteínas de manera transitoria en plantas de tabaco por el método de Magniffection.
- 6.- Se puede detectar la presencia de las proteínas recombinantes BFVax y PreFVac en la extracción de proteína soluble total expresadas en plantas de tabaco por el método de Magniffection.

6. Perspectivas

- 1.- Implementar otra estrategia para concentrar, desalar y diluir en PBS las proteínas recombinantes obtenidas.
- 2.- Obtener la cantidad de proteína producida en *E. coli* por litro de medio LB y la pureza de cada proteína.
- 3.- Mejorar la extracción de proteína en planta por el método de Magniffection.
- 4.- Purificar las proteínas recombinantes producidas en tabaco.
- 5.-** Realizar ensayos de inmunización en ratones de la cepa BALB/c para detectar si las proteínas inducen la producción de anticuerpos y el balance Th1/Th2.

7. Metodología

7.1 Diseño de la proteína antigénica *PreFVac in silico*.

Para obtener las secuencias conservadas y antigénicas de la proteína de pre-fusión del VSR, se realizó una revisión de secuencias relevantes y un análisis bioinformático con ayuda de los servidores (Fig. 18) de GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) en donde se obtuvo la secuencia nucleotídica y de aminoácidos de la proteína de pre-fusión del VSR; se hizo un análisis en BLASTp (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) de otras secuencias de 10 cepas circulantes y finalmente un alineamiento en el programa MEGA 11 para seleccionar regiones conservadas. Para predecir los epítomos relevantes se evaluó la secuencia en el programa BepiPred 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/BepiPred-2.0/>) e IEDB (<https://www.iedb.org/>) se hizo un análisis de antigenicidad en VaxiJen v2.0 (<https://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>), análisis de alergenicidad en AllerTOPv.2.0 (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/>) los parámetros fisicoquímicos de la construcción se obtuvieron en Expasy-ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>). Se envió a sintetizar la secuencia nucleotídica del gen *PreFVac* a la empresa GenScript y se solicitó su optimización para expresión en bacteria y planta, se obtuvo el gen *PreFVac* en el vector de expresión pET28 b (+) para expresar en *E. coli*, y para el segundo gen en un vector de clonación pUC57 para subclonarlo luego en un vector de expresión (pICH11599) en plantas de tabaco.

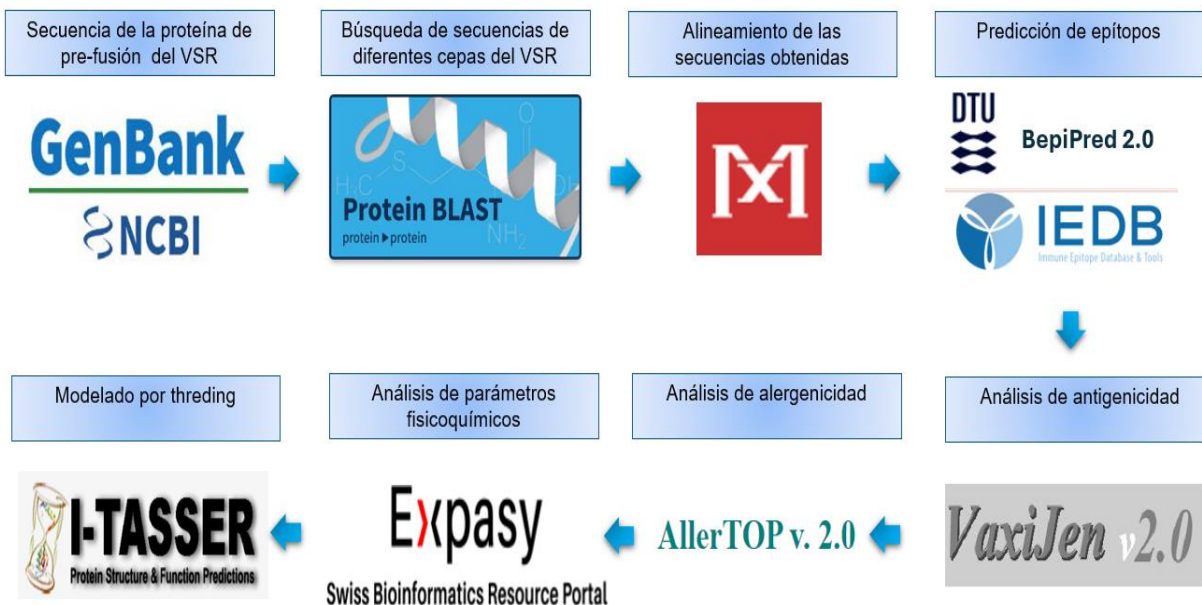


Figura 19. Herramientas bioinformáticas para el diseño *in silico* de la proteína PreFVac. Se muestran los programas bioinformáticos empleados para el diseño de la proteína antigénica de forma cronológica.

7.2 Sistemas de expresión

7.2.1 *Escherichia coli*

7.2.1.1 PCR y perfil de restricción para verificar la presencia de los genes *BFVax* y *PreFVac* en pET28 b (+).

El gen *BFVax* previamente se clonó en pET28 b (+) y transformado en *E. coli* BL21 por choque térmico y resguardado como stock de glicerol a -80°C. Se realizó una miniprep por kit del stock de glicerol de la construcción *BFVax* en pET28b (+) en BL21 y posteriormente una PCR (Tabla 8; Tabla 9) con oligonucleótidos específicos (Tabla 7) para detectar el gen de interés. El gen *PreFVac* lo envió liofilizado la empresa GenScript ya clonado en el vector de expresión pET28b (+) en una cantidad de 4 µg, este se disolvió en 100 uL de agua miliQ obteniendo una concentración final de 40 ng/µL. Se tomaron 4 uL para transformar por choque térmico en células competentes por calcio de la cepa *Escherichia coli* BL21, usando kanamicina (50 µg/mL) como marcador de selección, posteriormente se hizo un stock en glicerol basado en el protocolo de Addgene (500 mL de glicerol al 50% y 500 mL de cultivo crecido toda la noche a 37°C de la construcción), se realizó una miniprep por kit y posteriormente una doble digestión con *NcoI/HindIII* (0.25 µL de cada enzima en un total de 20 µL), cada una tiene una concentración de 20,000 U/mL con lo cual se obtuvo una concentración final en la reacción de 0.25 U/µL, estas condiciones son necesarias para digerir 1 µg de DNA.

Tabla 7. Oligonucleótidos que amplifican región del gen *BFVax*.

Oligonucleótidos	Secuencia
FORWARD	5' TTGGACCAGGACCAGGAACAC 3'
REVERSE	5' CTGCAAGAACAACCTCCTGCAA 3'

Tabla 8. Mezcla de reactivos de PCR.

Volumen (µL) por reacción	Componentes	Concentración final
10	Buffer Taq polimerasa 5X	1X
0.5	dNTPs (10 mM)	100 µM
1	Oligo Forward (100 µM)	2 µM
1	Oligo Reverse (100 µM)	2 µM
0.5	Taq polimerasa (5U/µL)	2.5 U
2	Muestra de DNA (50 ng/µL)	2 ng/µL
3	MgCl ₂ (25 mM)	1.5 mM
Variable	Agua miliQ estéril	Añadir hasta completar 50 µL
50	Volumen total	

Tabla 9. Condiciones de PCR.

Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
1 ciclo	40 ciclos			2 ciclos
94 °C 5 minutos	94 °C 30 segundos	58 °C 30 segundos	72 °C 30 segundos	72 °C 7 minutos

7.2.1.2 Expresión y extracción de las proteínas BFVax y PreFVac.

Para expresar las proteínas recombinantes de los genes *BFVax* y *PreFVac*, primero se inocula una asada del stock de glicerol de cada construcción en 10 mL de LB suplementado con kanamicina (50 µg/mL) se deja crecer toda la noche a 37°C en agitación, al día siguiente se toma 1/100 para obtener más cantidad de cultivo, se espera de 3 a 4 h hasta que tengan una $OD_{600nm} = 0.5$ a 0.8 para poder inducir con IPTG 1 mM y se deja a 21°C en agitación toda la noche.

Para la extracción de proteína se obtiene la biomasa de cada cultivo centrifugando a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, se descarta el sobrenadante y la biomasa se resuspendió en buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM pH =8) y se adiciona coctel inhibidor de proteasas, se sonica a 30% de amplitud con 15 segundos de pulso y 10 de descanso durante 5 minutos, se centrifuga a 12,000 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante se recolecta debido a que en este paso se encuentran las proteínas obtenidas de la fracción soluble de la extracción bacteriana, por consiguiente para obtener las proteínas de la fracción insoluble, la biomasa se lava con buffer de lisis + 2% de tritónX100, se siguen las mismas condiciones de sonicación y se centrifuga a 4,500 rpm, durante 20 minutos a 4 °C, se descarta el sobrenadante y se añade buffer de extracción para obtener la fracción insoluble (NaH_2PO_4 0.1M, Tris base 100 mM, hidrocloreuro de guanidina 6 M pH= 8), se siguen las mismas condiciones de sonicación y se centrifuga a 4500 rpm, durante 20 minutos a 4 °C, el sobrenadante es lo que se conoce como extracto de proteína insoluble total.

7.2.1.3 Purificación de proteínas recombinantes

La purificación de las proteínas es necesaria para eliminar otras proteínas bacterianas producidas *en E. coli*. Debido a la cola de histidina (6xHIS) que tiene cada una de las construcciones de BFVax y PreFVac, se puede hacer empleo de la purificación por columna con resina de níquel por la afinidad que tiene la histidina a dicho elemento químico. Con el buffer de lisis como base se le agregan diferentes concentraciones de imidazol, 20 mM, 50 mM, 250 mM y 500 mM, primero se coloca el extracto total en la columna con resina de níquel y se deja en contacto con agitación durante 1 h, después se eluye por gravedad, luego se hace un lavado extenso con 20 mM, y se eluye 3 veces con las demás concentraciones mencionadas, se recolecta cada fracción y se resguarda a -20°C.

7.2.1.4 Western blot

La presencia de las proteínas se detectó por Western blot, primero se corre un gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 100 voltios durante aproximadamente 2 h y después se transfiere a una membrana de nitrocelulosa con ayuda del equipo Trans-Blot Turbo de BIO RAD seleccionando el set de 2.5 A, 25V durante 10 minutos, a esta membrana se le hacen 3 lavados (5 minutos cada uno), con PBS-Tween20, después se le retira mayormente por decantación la solución de lavado y se le coloca PBS con BSA al 3% (solución de bloqueo) durante 1 h, se realizan otros 3 lavados con PBS-Tween20, y enseguida se coloca el anticuerpo primario (anti-Histidina o anti-F) a una dilución 1:2,500 y 1:8,000 respectivamente, después se deja incubando toda la noche a 4°C, luego se realizan otros 3 lavados con PBS-Tween20 y se añade el anticuerpo secundario anti-fosfatasa alcalina como anticuerpo secundario (1:2,500) durante 1 h a temperatura

ambiente, finalmente se revela con reactivo colorimétrico; se siguió el mismo procedimiento para el revelado por el método quimioluminiscente, pero se agregó anti-HRP como anticuerpo secundario (1:2,500) y se reveló con peroxidasa.

7.2.1.5 Concentración de proteína por centrifugación

La concentración de las proteínas se realizó por medio de filtros centrífugos Amicon Ultra 0.5 de 10 kDa, que consisten en un tubo de colección con un filtro de 10 kDa. Se colocan 500 μ L de la fracción purificada en el filtro y se centrifuga a 10,000 rpm durante 15 minutos, después se descarta todo el líquido del tubo de colección y se vuelven a colocar otros 500 μ L y se sigue el mismo proceso, el contenido que permanece en el filtro es la proteína concentrada, para desalar (quitar imidazol) y diluirla, se le agregan aproximadamente 400 μ L de PBS se centrifuga a 10,000 rpm durante 15 minutos y se descarta lo que quedó en el tubo y el filtro se coloca de manera inversa en un tubo Eppendorf limpio y se centrifuga a 1,000 rpm durante 1 minuto para obtener la solución de cada una de las proteínas concentradas en PBS.

7.2.1.6 Método de Bradford

Para cuantificar la cantidad de proteína obtenida se realiza una curva de Bradford empleando la proteína BSA como estándar (Fig. 12) con las siguientes concentraciones (μ g/ μ L): 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.8, 3.9, se colocan 10 μ L de cada una más 190 μ L del reactivo de Bradford 1X por triplicado en una microplaca PolySorp y de igual forma se colocan 10 μ L de la muestra de las proteínas de interés, se mide la absorbancia a 595 nm a los 0, 10, 15 y 30 minutos, es importante destacar que se utilizaron las absorbancias obtenidas a los 10 minutos. El cálculo de la concentración se realizó

utilizando la fórmula de la ecuación de la recta obtenida de la curva de BSA de la siguiente manera:

Ecuación de la recta

$$y = 0.0016x + 0.2736$$

Despeje de x (Concentración)

$$x = \frac{y - 0.2736}{0.0016}$$

Cálculo para la obtención de concentración:

BFVax:

$$x = \frac{0.313 \text{ abs} - 0.2736 \text{ abs}}{0.0016 \text{ abs}/(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}})}$$

$$x = 24.31 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

PreFVac:

$$x = \frac{0.741 \text{ abs} - 0.2736 \text{ abs}}{0.0016 \text{ abs}/(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}})}$$

$$x = 292.13 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

7.2.2 Plantas de tabaco

7.2.2.1 Estandarización de la técnica de Magniffection

Se siguió el protocolo reportado por Marillonnet *et al.* (2004) y Giritch *et al.* (2006). Los módulos previamente habían sido introducidos por electroporación en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, cada uno se inocula en 50 mL de LB suplementado con Carbenicilina (50 µg/mL) y se dejan crecer a 28 °C en agitación durante 2 días, para obtener más cultivo se inocula 1/100 en LB suplementado con Carbenicilina (50 µg/mL) y se deja crecer en las mismas condiciones pero solo durante 1 día hasta alcanzar una $OD_{625nm}=1.6-2.5$, se centrifugan los inóculos a 8,000 rpm durante 20 minutos y el pellet o pastilla se resuspendió en buffer de infiltración (MES 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM pH=5.5), después se mezclan en 1 L de buffer de infiltración, donde se coloca la parte aérea de la planta y por medio de una bomba de presión se aplica vacío durante un minuto para agroinfiltrar las hojas, esto se repite 2 veces más, finalmente la planta se vuelve a colocar en la maceta con tierra y se deja reposar para la replicación viral a los 5, 8 y 11 días post infección (dpi) se arrancan las hojas de la planta y se colocan bajo luz UV en un microscopio de fluorescencia (para el caso del módulo que expresa GFP).

7.2.2.2 PCR de la construcción del gen *BFVax* en pICH11599

El gen *BFVax* estaba previamente clonado en pICH11599 (módulo 3') y transformado por electroporación en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 y almacenado en stock de glicerol a -80 °C, se necesitaba comprobar su inserción en la construcción por lo que se realizó una miniprep del stock de glicerol del *BFVax* en pICH11599 y después una PCR (Tabla 8; Tabla 9) con los oligos correspondientes (Tabla 7).

7.2.2.3 Subclonación del gen de interés *PreFVac* en pICH11599

El gen *PreFVac* se sintetizó por GenScript en el vector de clonación pUC57, por lo que era necesaria su digestión y posterior clonación en un vector de expresión pICH11599.

Para la clonación de *PreFVac* en el módulo 3', la construcción *PreFVac*-Puc57 se rehidrató con agua miliQ después se transformó 1 µL del DNA por choque térmico en *Escherichia coli* cepa TOP 10, se hizo miniprep y posteriormente se digirió 4 µL de DNA con las enzimas *NcoI/SacI* (0.25 µL c/u). Se purificó la banda obtenida de 744 pb (gen de interés) y se ligó con la enzima T4 ligasa (1µL), en el vector pICH11599 previamente digerido con las mismas enzimas y purificado.

7.2.2.4 Perfil de restricción y PCR de la construcción del gen *PreFVac* en pICH11599

Para comprobar la inserción del gen *PreFVac* en pICH11599 se realizó un perfil de restricción con las enzimas *NcoI/SacI*, (0.25 µL de cada enzima en un total de 20 µL), cada una tiene una concentración de 20,000 U/mL obteniendo una concentración final en la reacción de 0.250 U/µL, estas condiciones son necesarias para digerir 1 µg de DNA. En lo que respecta la PCR se diseñaron oligos específicos (Tabla 10) y se siguió la metodología mencionada 5.2.1.1, se empelaron las mismas cantidades de cada uno

de los componentes de la mezcla de reactivos según la Tabla 8 y los mismos parámetros en el termociclador (Tabla 9) a excepción de la temperatura de alineamiento que en este caso es de 60 °C.

Tabla 10. Oligonucleótidos que amplifican región del gen *PreFVac*.

Oligonucleótidos	Secuencia
FORWARD	5' CAAACCTCCCAATAAGCCAAATAA 3'
REVERSE	5' ACGTACTGGTTGGTATACTTCCGT 3'

7.2.2.5 Expresión transitoria y extracción de BFVax y PreFVac en plantas de tabaco por el método de Magnifection

Para obtener las proteínas recombinantes producidas en planta; BFVax ya estaba previamente clonado en pICH11599 transformada en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* y para PreFVac se transformó la construcción *PreFVac*-pICH11599 en GV3101 por electroporación. Al tener la construcción correspondiente de cada gen para obtener la expresión transitoria se sigue el protocolo que se mencionó en el apartado 5.2.2.1 Estandarización de la técnica de “Magnifection”. Las proteínas se extrajeron a los 8 dpi, primero se maceran las hojas con nitrógeno líquido y se utilizan 500 µL del buffer (Tris-HCl 0.1 M, EDTA 5 mM pH=8.3 y coctel inhibidor de proteasas) para 100 mg de material vegetal, después se sónica en hielo a una amplitud de 30% con pulsos de 10 segundos y descanso de 10 segundos durante 1 minuto, luego se mantiene en contacto por agitación media hora a 4°C, finalmente se centrifuga a 13,000 rpm por 20 minutos a 4°C. Se toma el sobrenadante (proteína soluble total) y se analiza por Western blot la proteína BFVax siguiendo los pasos mencionados en el apartado 5.1.2.4 Western blot,

usando como anticuerpo primario anti-histidina 1:5,000 y anticuerpo secundario fosfatasa alcalina 1:5,000, y revelando con sustrato colorimétrico. En lo que respecta la proteína Pre-FVac se realizó un dot blot como se menciona en el apartado 5.2.2.5 Dot blot, para comprobar la presencia de PreFVac usando como anticuerpo primario anti-histidina 1:2,500 y anticuerpo secundario anti-HRP para revelarlo con peroxidasa.

7.2.2.6 Dot blot

Se colocan 2 µL de la proteína total soluble BFVax, PreFVac y wild type por separado en una membrana de nitrocelulosa y se deja secar y después se pone una solución de bloqueo PBS-BSA 3%, se realizan 3 lavados PBS-Tween20 de 5 minutos cada uno, se añade el anticuerpo primario (Anti-His) 1:5,000 y se incuba por una hora a temperatura ambiente, se realizan otros 3 lavados y se coloca el anticuerpo secundario (anti-HRP) y se incuba por 1 hora a temperatura ambiente, se realizan los últimos 3 lavados y se revela con el reactivo de peroxidasa (método quimioluminiscente).

8. Bibliografía

- Bolt G, Pedersen LØ, Birkeslund HH (2000) Cleavage of the Respiratory Syncytial Virus fusion protein is required for its surface expression: role of furin. *Virus Research* 68: 25–33, doi:10.1016/S0168-1702(00)00149-0
- Bulkow LR, Singleton RJ, Karron RA, Harrison LH (2002) Risk factors for severe Respiratory Syncytial Virus infection among Alaska native children. *Pediatrics* 109: 210–216, doi:10.1542/peds.109.2.210
- CDC (2023) Learn about Respiratory Syncytial Virus infection (RSV). Centers for Disease Control and Prevention, <https://www.cdc.gov/rsv/index.html>
- Collins PL (1991) The Molecular Biology of Human Respiratory Syncytial Virus (RSV) of the Genus Pneumovirus. D.W. Kingsbury (ed.) *The Paramyxoviruses*. Boston, MA: Springer US (The Viruses), pp. 103–162, doi:10.1007/978-1-4615-3790-8_4
- Collins PL y Karron RA (2013) Respiratory Syncytial Virus and metapneumovirus, in *Fields Virology: Sixth Edition*. Wolters Kluwer Health Adis (ESP), <https://pure.johnshopkins.edu/en/publications/respiratory-syncytial-virus-and-metapneumovirus>
- Divarathna MVM, Rafeek RAM, Morel AJ, Aththanayake C, Nordeen F (2023) Epidemiology and risk factors of respiratory syncytial virus associated acute respiratory tract infection in hospitalized children younger than 5 years from Sri Lanka, *Frontiers in Microbiology* 14: 1173842, doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1173842>
- Garegnani L, Styrmisdóttir L, Rodriguez PR, Escobar CM, Esteban I, Franco JV (2021) Palivizumab for preventing severe Respiratory Syncytial Virus (RSV) infection in children. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 11, doi: 10.1002/14651858.CD013757.pub2.
- Garofalo RP, Welliver RC, Ogra PL (2005) Clinical Aspects of Bronchial Reactivity and Cell–Virus Interaction. *Mucosal Immunology* (Third Edition). Burlington: Academic Press, pp. 1433–1450, doi:10.1016/B978-012491543-5/50087-5
- Giritch A, Marillonnet S, Engler C, Eldik Gv, Botterman J, Klimyuk V, Gleba Y (2006) Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(40):14701–14706, doi:10.1073/pnas.0606631103
- Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S (2005) Magniffection—a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine* 23(17): 2042–2048, doi, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.01.006>

- Glezen WP, Paredes A, Allison JE, Taber LH, Frank AL (1981) Risk of Respiratory Syncytial Virus infection for infants from low-income families in relationship to age, sex, ethnic group, and maternal antibody level. *The Journal of Pediatrics* 98: 708–715, doi:10.1016/S0022-3476(81)80829-3
- Graham BS (2017) Vaccine development for Respiratory Syncytial Virus. *Current Opinion in Virology* 23:107–112, doi: 10.1016/j.coviro.2017.03.012
- Grodberg J y Dunn JJ (1988) ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *Journal of Bacteriology* 170(3): 1245–1253, doi: <https://doi.org/10.1128/jb.170.3.1245-1253.1988>
- Javanshad R, Taylor CJ, Delavari N, Barkman TJ, Stull F, Venter AR (2023) Analysis of histidine-tagged recombinant proteins from nickel and copper coated surfaces by direct electrospray ionization and desorption electrospray ionization mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 37(S1): e9516, doi: <https://doi.org/10.1002/rcm.9516>
- Ke Z, Dillard RS, Chirkova T, Leon F, Stobart CC, Hampton CM (2018) The morphology and assembly of Respiratory Syncytial Virus revealed by cryo-electron tomography. *Viruses* 10: 446, doi:10.3390/v10080446
- Kim HW, Canchola J, Brandt CD, Pyles G, Chanock RM, Jensen KE, Parrott RH (1969) Respiratory Syncytial Virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *American Journal of Epidemiology* 89: 422–434, doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a120955.
- Knudson CJ, Hartwig SM, Meyerholz DK, Varga SM (2015) RSV vaccine-enhanced disease is orchestrated by the combined actions of distinct CD4 T cell subsets. *PLOS Pathogens* 11(3): e1004757, doi:<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004757>
- Langedijk AC, Harding ER, Konya B, Vrancken B, Lebbink RJ, Evers A, Willemsen J, Lemey P, Bont L (2022) A systematic review on global RSV genetic data: Identification of knowledge gaps. *Reviews in Medical Virology* 32: 2284, doi:10.1002/rmv.2284
- Lugade AA, Kalathil S, Heald JL, Thanavala Y (2010) Transgenic plant-based oral vaccines. *Immunological Investigations* 39(4–5): 68–482, doi:<https://doi.org/10.3109/08820131003622643>
- Marillonnet S, Giritch A, Gils M, Kandzia R, Klimyuk V, Gleba Y (2004) In planta engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America 101(18): 6852–6857. doi: 10.1073/pnas.0400149101

- Mazur NI, Terstappen J, Baral R, Bardají A, Beutels P, Buchholz UJ, Cohen C, Crowe JE, Cutland C, Eckert LO, Feikin DR, Fitzpatrick T, Fong Y, Graham BS, Heikkinen T, Higgins D, Hirve S, Klugman KP, Kragten-Tabatabaie L, Bont L (2023) Respiratory Syncytial Virus prevention within reach: the vaccine and monoclonal antibody landscape. *The Lancet Infectious Diseases* 23: 2–21, doi:10.1016/S1473-3099(22)00291-2
- McLellan JS, Chen M, Leung SS, Graepel KW, Du X, Yang Y, Zhou T, Baxa U, Yasuda E, Beaumont T, Kumar A, Modjarrad K, Zheng Z, Zhao M, Xia N, Kwong PD, Graham BS (2013) Structure of RSV fusion glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody. *Science* 340: 1113–1117, doi:10.1126/science.1234914
- Openshaw PJ (2002) Potential therapeutic implications of new insights into Respiratory Syncytial Virus disease. *Respiratory Research* 3: 3, doi:10.1186/rr184
- Palmer I y Wingfield PT (2004) Preparation and Extraction of Insoluble (Inclusion-Body) Proteins from *Escherichia coli*. *Current Protocols in Protein Science*: editorial board, doi: <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0603s38>
- Rodriguez-Fernandez R, Mejias A, Ramilo O (2021) Monoclonal antibodies for prevention of Respiratory Syncytial Virus infection. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 40: 35, doi:10.1097/INF.0000000000003121
- Rosano GL y Ceccarelli EA (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology* 5, doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Sezonov G, Joseleau-Petit D, D'Ari R (2007) *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology* 189(23): 8746–8749, doi:<https://doi.org/10.1128/JB.01368-07>
- Shanmugam A, Rajoria S, George AL, Mittelman A, Suriano R, Tiwari RK (2012) synthetic Toll Like Receptor-4 (TLR-4) agonist peptides as a novel class of adjuvants. *PLoS ONE* 7(2): e30839, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030839>
- Shiloach J y Fass R (2005) Growing *E. coli* to high cell density—A historical perspective on method development. *Biotechnology Advances* 23(5): 345–357, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.04.004>
- Srikantiah P, Vora P, Klugman KP (2021) Assessing the full burden of Respiratory Syncytial Virus in young infants in low- and middle-income countries: The importance

of community mortality studies. *Clinical Infectious Diseases* 73: S177–S179, doi: <https://doi.org/10.1093/cid/ciab486>

- Su C, Zhong Y, Zhao G, Hou J, Zhang S, Wang B (2022) RSV pre-fusion F protein enhances the G protein antibody and anti-infectious responses. *npj Vaccines* 7(1): 1–11, doi: <https://doi.org/10.1038/s41541-022-00591-w>
- Talukdar SN, McGregor B, Osan JK, Hur J, Mehedi M (2023) Respiratory Syncytial Virus Infection does not induce epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Virology* 97(7): e0039423, doi: <https://doi.org/10.1128/jvi.00394-23>
- Wilkins D, Yuan Y, Chang Y, Aksyuk AA, Núñez BS, Wählby-Hamrén U, Zhang T, Abram ME, Leach A, Villafana T, Esser MT (2023) Durability of neutralizing RSV antibodies following nirsevimab administration and elicitation of the natural immune response to RSV infection in infants. *Nature Medicine* 29(5):1172–1179, doi: <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02316-5>
- Zeng R-H, Gong W, Fang X-P, Zhang Z-Y, Mei X-G (2005) Plasmid construction, expression, immunogenicity and protective efficacy of recombinant protein candidate vaccine of respiratory syncytial virus. *Chinese Journal of Biotechnology* 21(4): 534–539.
- Zhang S, Akmar LZ, Bailey F, Rath BA, Alchikh M, Schweiger B, Lucero MG, Nillos LT, Kyaw MH, Kieffer A, Tong S, Campbell H, Beutels P, Nair H (2020) Cost of Respiratory Syncytial Virus-associated acute lower respiratory infection management in young children at the regional and global level: A systematic review and meta-analysis. *The Journal of Infectious Diseases* 222: S680–S687, doi: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz683>

9. Anexos

9.1 Material y equipo

9.1.1 Biológico

Nombre	Proveedor
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa GV3101	Donadas por el Dr. Korban de la Universidad de Illinois en Urbana- Champaign, USA
<i>Escherichia coli</i> TOP 10	Donada por el Dr. Argüello-Astorga del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica
Semillas de tabaco (<i>Nicotiana benthamiana</i>)	Donada por el Dr. Argüello-Astorga del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica
Semillas de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>) sin nicotina	Donadas por la Dra. Menassa de Ontario, Canadá
Vectores virales de Magniffection Módulo 3' (pICH11599) Módulo 5' (pICH7388) Módulo integrasa (pICH7410)	Donados por el Dr. Gleba de la compañía ICON GENETICS
<i>Escherichia coli</i> BL21	Cepario del laboratorio de Biología Molecular de Plantas, IPICYT
Liofilizado gen <i>PreFVac</i> en Pet28b (+)	GenScript

Liofilizado gen <i>PreFVac</i> en Puc57	GenScript
Stock en glicerol de gen <i>BFVax</i> en pET28b (+)	Construcción realizada por Dra. Benita Ortega
Stock en glicerol gen <i>BFVax</i> en pICH11599	Construcción realizada por Dra. Benita Ortega

9.1.2 Reactivos

Nombre del reactivo	Proveedor
Ácido acético glacial	GOLDEN BELL
Ácido bórico	SIGMA
Ácido clorhídrico	Karal
Acrilamida 30%	BIO-RAD
Agar bacteriológico	BD Bioxon
Agarosa	SIGMA
Albúmina de suero bovino	SIGMA
Ampicilina	USB
Azul de bromofenol	Fermont
Bactotripton	BD
Bromuro de etidio	PROMEGA
BSA 10 mg/mL	BioLabs
Buffer rCutSmart	BioLabs
5X Green GoTaq Flexi Buffer	PROMEGA
10X Buffer T4 DNA ligasa	BioLabs
Carbenilicina	CARBENICILLIN
Cloruro de calcio	SIGMA
Cloruro de cobalto	SIGMA
Cloruro de potasio	USB
Cloruro de sodio	CTR Scientific

Coctel de inhibidores de proteasa	SIGMA
Azul brillante G y R (Azul coomassie)	Aldrich
EDTA	USB
Enzimas de restricción	
<i>NcoI</i> -HF	BioLabs
<i>SacI</i> -HF	BioLabs
<i>HindIII</i>	BioLabs
<i>KpnI</i>	Invitrogen
Etanol 96%	CTR
Extracto de levadura	SIGMA
Phytigel	SIGMA
Fosfato de potasio monobásico	JT Baker
Fosfato de sodio monobásico anhidro	SIGMA
Fosfato potásico monobásico	JT Baker
Fosfato sódico dibásico	SIGMA
Glicerol	Caledon
Glicina	SIGMA
Guanidina	Fluka
Hidróxido de sodio	JT Baker
Imidazol	SIGMA
IPTG	Bioline
Kanamicina	Gibco BRL

Kit de purificación de DNA: Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	PROMEGA
Marcador de peso molecular DNA 1Kb	BioLabs
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
MES	USB
Metanol	CTR
Molibdato de sodio	SIGMA
Nitrato de amonio	SIGMA
Nitrato de potasio	CTR
PEG 4000	Thermo Scientific
Persulfato de amonio	USB
QIAprep Spin Miniprep kit	QIAGEN
ProBond™ Resin	Invitrogen
Sacarosa	SIGMA
SDS	IBI Shelton
Sulfato de amonio	JT Baker
Sulfato de cobre	SIGMA
Sulfato de magnesio-6 H ₂ O	Fluka
Sulfato de manganeso-6 H ₂ O	SIGMA
Sulfato de Zinc	Phytotechnology
Sulfato ferroso heptahidratado	SIGMA
T4 DNA ligasa	BioLabs

TEMED	Invitrogen
Tierra para macetas	Sungro HORTICULTURE
Tris base	Invitrogen
Triton X100	SIGMA
Tween 20	USB
Yoduro de potasio	SIGMA
B-Mercaptoetanol	Aldrich
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (5X)	BIO-RAD
Anti-histidina (anticuerpo monoclonal anti-ratón)	Genscript
Anti-F VSR (anticuerpo anti-ratón monoclonal anti-ratón)	Invitrogen
Anti-fosfatasa alcalina producido en conejo (IgG anti-ratón)	Sigma
Anti-HRP (IgG anti-ratón)	Life technologies
Sustrato para detección de HRP	Thermo scientific
Tabletas NBT/BCIP (Sustrato de fosfatasa alcalina)	Roche/SIGMA
Nitrógeno líquido	Taylor-wharton

9.1.3 Equipos

- Agitador magnético/placa caliente CORNING modelo PC-420
- Agitador orbital Lumistell modelo AOM-300
- Agitador Thermo Scientific modelo Multi-purpose rotator
- Balanza analítica OHAUS modelo Pioneer
- Balanza analítica SCIENTECH modelo SA210D
- Balanza granataria OHAUS modelo 1400
- Baño maría digital Fisher Scientific modelo ISOTEMP 1025
- Bomba de vacío WELCH modelo 2546B-01 A
- Calentador de baño seco Fisher Scientific
- Calentador Thermo mix modelo HCM100-PRO
- Cámara de electroforesis BIO-RAD modelo MiniPROTEAN Tetra Cell
- Cámara de electroforesis Mini-Horizontal Unit Fisher Biotech modelo FB-SB-710
- Campana de extracción de humos Fisher modelo CS
- Campana de flujo laminar Fisher Alder
- Centrífuga BECKMAN COULTER modelo Avanti J-301
- Centrífuga de mesa megafuge 1.0 modelo Heraeus
- Centrífuga Eppendorf modelo MiniSpin
- Centrífuga refrigerada Hettich modelo UNIVERSAL 320 R
- Electroporador BTX modelo ECM 630
- Espectrofotómetro BIO-RAD modelo smartspec plus
- Espectrofotómetro Thermo Scientific modelo NanoDrop 2000
- Fotodocumentador BIO-RAD modelo ChemiDocMP

- Fotodocumentador BIO-RAD modelo Gel Doc XR+
- Fuente de poder BIO-RAD modelo PowerPac Basic
- Fuente de poder Thermo EC
- Horno de microondas Mabe
- Incubadora agitadora HIPOTECH modelo H2OcX300
- Lector de microplacas BIO-RAD modelo iMark
- Microcentrífuga refrigerada Kendro Laboratory Products modelo Heraeus
- Micropipetas Gilson
- Microscopio estereoscópico Leica
- Potenciómetro Thermo modelo Orion Star
- Procesador ultrasónico SONICS modelo Vibra cell
- Refrigerador a 4°C TORREY
- Congelador vertical a -21°C FRIGIDAIRE modelo FFFH21F6QW
- REVCO Thermo Scientific modelo Value plus
- Rotador Benchmark Scientific modelo Roto-MiNi
- Incubadora para laboratorio Lúmina modelo IRO-65
- Sistema de transferencia BIO-RAD modelo Trans-Blot Turbo
- Vórtex Scientific Industries modelo genie 2
- Cámara bioclimática de plantas Lumistell modelo MAC-510
- Cuarto acondicionado para cultivo *in vitro* Lumistell modelo AS-016