



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Análisis inmunológico de una proteína contra influenza
A H1N1 producida en microalgas y diseño de una
proteína antigénica contra influenza A H1N1 y A H3N2**

Tesis que presenta

Karen Aimé Figueroa Valenzuela

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de Tesis

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

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



Constancia de aprobación de tesis

La tesis “**Análisis inmunológico de una proteína contra influenza A H1N1 producida en microalgas y diseño de una proteína antigénica contra influenza A H1N1 y A H3N2**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Karen Aimé Figueroa Valenzuela** y aprobada el **día 24 de septiembre 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 tesis

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Antonio De León Rodríguez
Miembro del Comité Tutorial



Créditos institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas y el cuarto de estancia de animales 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 el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías No. de registro 1151084 y apoyo del Fideicomiso CEEPAC SLP No. 18397, para la realización de los experimentos.

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

Dedicatorias

A Dios por guiarme siempre.

A mi mamá Aimé Valenzuela Miranda por darme la vida y su amor incondicional, enseñarme a ser una mujer fuerte, ser mi ejemplo a seguir y apoyarme en todo lo que me propongo.

A mi hermana Jimena Abigail por darme motivación, ser mi amiga, consejera y darme su cariño.

A mi bisabuela Consuelo Valenzuela por darme palabras de aliento, la sabiduría e impulsarme a seguir adelante.

A mis tías Monserrat y Cynthia por el apoyo, la motivación y el cariño brindado.

A mis mejores amigas María Esther, Nohemí y Febe por estar siempre cuando los necesité, sus consejos, por alegrarme mis días y su amistad incondicional.

A mis hermanos de corazón, Karen y Alejandro, por su amor incondicional, sus consejos, la motivación, sus aportaciones indispensables y el cariño brindado.

A Vanilla por darme alegría y sentido a mi vida.

Agradecimientos

Un agradecimiento especial al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís por darme su confianza, valiosas enseñanzas, su paciencia y brindarme el apoyo para la realización de este trabajo. Así mismo, el honor de ser parte de su grupo de investigación.

A la Dra. Karen Lizbeth Reyes Barrera por ser mi guía esencial y mentora para la continuación de este proyecto, por sus enseñanzas, su paciencia, sus valiosos consejos, su apoyo y amistad incondicional.

A la Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro por sus valiosos consejos, aportaciones y la motivación para continuar.

Al Dr. Antonio de León Rodríguez por sus valiosas sugerencias a mi trabajo.

Al Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga por su apoyo, consejos atinados y su amistad brindada.

A la QFB Rosalba Castillo Collazo y al Biol. Salvador Ambriz Granados por su ayuda, enseñanzas, asistencias brindadas.

Al M.C. Alejandro Romo por sus valiosos consejos, su ayuda, palabras de aliento y su valiosa amistad.

Al Dr. Daniel Páez por sus aportaciones, consejos, y amistad brindada.

A la Sra. Rosita por sus palabras de aliento, su ayuda y amistad brindada.

A mis compañeros y amigos Jennifer, Benita, Nadia, Deyanira, Melvin y Mario del laboratorio de Biología Molecular de Plantas del IPICYT.

A los compañeros del servicio social por su ayuda en los experimentos con ratones.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. (IPICYT) por el apoyo y la oportunidad para continuar con mis estudios.

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

Al CONACYT por el financiamiento con la beca de maestría para la realización del presente trabajo.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Abreviaturas	xi
Resumen	xii
Abstract	xiii

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1. Etiología y características del virus de la influenza	5
2.1.1. Tipos de virus de la influenza	6
2.1.2. Deriva y cambio antigénico	7
2.1.3. Ecología del virus de la influenza	8
2.1.4. Mecanismos de respuesta inmune contra el virus de la influenza	9
2.2. Gripe de la influenza A y su importancia	10
2.2.1. Sintomatología	10
2.2.2. Factores de riesgo	12
2.2.3. Complicaciones	12
2.2.4. Epidemiología	14
2.3. Vacunas	16
2.3.1. Vacunas actuales contra la influenza	17
2.3.2. Proteínas recombinantes vacunales	18
2.4. Sistemas de expresión para producción de proteínas recombinantes	19
2.4.1. Bacterias	19
2.4.1.1. <i>E. coli</i> BL21	19
2.4.1.2. <i>E. coli</i> BL21-Rossetta	20
2.4.2. Plantas	20
2.4.2.1. Vacunas comestibles	21
2.4.2.2. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	22
2.4.2.3. Obtención de P.A. en <i>E. coli</i> BL21	22
3. OBJETIVOS	24
3.1. Objetivo general	24
3.2. Objetivos específicos	24
3.2.1. Análisis de proteína antigénica (P.A.) expresada en <i>C. reinhardtii</i>	24
3.2.2. Diseño de gen sintético antigénico	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS	26
4.1. Material y equipo	26

4.2.	Proteína antigénica (P.A.) transformada en microalgas	26
4.2.1.	Diseño y construcción de la proteína antigénica (P.A.)	26
4.2.2.	Transformación de P.A. en microalgas <i>C. reinhardtii</i>	28
4.2.3.	Medio de cultivo y condiciones de crecimiento para <i>C. reinhardtii</i>	28
4.2.4.	Producción de biomasa algal transformada y no transformada	29
4.2.5.	Extracción de proteínas solubles e insolubles de biomasa microalgal transformada	29
4.2.6.	Cuantificación de proteínas solubles e insolubles en extractos de microalgas	30
4.3.	Producción de la proteína antigénica (P.A) en <i>E. coli</i>	31
4.3.1.	Expresión de P.A. en <i>E. coli</i>	31
4.3.2.	Obtención de P.A. en <i>E. coli BL21</i>	31
4.3.3.	Curva estándar de P.A. transformada en <i>E. coli BL21</i>	32
4.3.4.	Purificación por método desnaturizante de P.A. transformada en <i>E. coli Rosetta</i>	33
4.4.	Inmunización en ratonas BALB/c	34
4.4.1.	Condiciones de mantenimiento de ratonas BALB/c	34
4.4.2.	Inmunizaciones	35
4.4.3.	Determinación y cuantificación de anticuerpos policlonales	36
4.5.	Construcción de Proteína Antigénica Mejorada (P.A.M.) contra el virus de la Influenza A H1N1 y H3N2	37
4.5.1.	Diseño bioinformático de la proteína antigénica mejorada	37
5.	RESULTADOS	40
5.1.	Proteína antigénica (P.A.)	40
5.1.1.	Obtención de P.A. en <i>E. coli BL21</i>	40
5.1.2.	Estandarización de curva patrón para cuantificación de P.A. transformada	41
5.1.3.	Purificación de P.A. en <i>E. coli Rosetta</i>	43
5.1.4.	Cuantificación de P.A. en fracciones solubles e insolubles de extractos de microalgas transformantes	43
5.1.5.	Cuantificación de anticuerpos en suero, lavados gastrointestinales y lavados traqueopulmonares de ratonas BALB/c	45
5.2.	Análisis bioinformático de Proteína Antigénica mejorada	50
5.2.1.	Análisis de alergenicidad de P.A. mejorada por AllerTopv 2.0	50
5.2.2.	Modelado de construcción de gen antigénico contra influenza	50
5.2.3.	Vector de expresión pET28b clonado con gen P.A. mejorado	51
6.	DISCUSION	53
6.1.	Influenza	53
6.2.	Producción de proteína P.A. en microalgas <i>C. reinhardtii</i> y <i>E. coli</i>	53
6.3.	Análisis inmunogénico de grupos de ratonas BALB/c administradas con P.A. expresada en microalgas	55
6.4.	Análisis bioinformático de gen de P.A. mejorado para H1N1 y H3N2	57
7.	CONCLUSIONES	61
8.	PERSPECTIVAS	62

9. REFERENCIAS	63
10. ANEXOS	72

Lista de tablas

Tabla 1. Formulación de vacunas actuales contra el virus de la influenza año 2022-2023	17
---	----

Lista de figuras

Figura 1. Estructura del virus de la influenza A	5
Figura 2. Distribución geográfica de la influenza y otras enfermedades respiratorias de la semana 45 del año 2023	15
Figura 3. Determinación de P.A. en extractos de proteína total soluble de líneas transgénicas y no transgénicas	24
Figura 4. Diseño de la proteína antigénica contra influenza A H1N1 a expresarse en microalgas	27
Figura 5. Construcción del gen antigénico mejorado (VanillaVax) contra la influenza A H1N1 y H3N2	39
Figura 6. Gel SDS-PAGE de P.A. en <i>E. coli</i> BL21	41
Figura 7. Curva estándar con P.A. purificada en <i>E. coli</i>	42
Figura 8. Identificación de la proteína de P.A.	43
Figura 9. Cantidad de P.A en la fracción de proteína soluble total de las microalgas.	44
Figura 10. Cantidad de P.A en la fracción de la proteína insoluble total de las microalgas.	44
Figura 11. Determinación de título de anticuerpos de tipo IgG de los grupos experimentales contra P.A.	46
Figura 12. Determinación de título de anticuerpos de tipo IgM de los grupos experimentales contra P.A.	47
Figura 13. Determinación de título de anticuerpos de tipo IgE de los grupos experimentales contra P.A.	48
Figura 14. Determinación de título de anticuerpos de tipo IgG de los grupos experimentales en lavados traqueopulmonares contra P.A.	49
Figura 15. Análisis de alergenicidad para la construcción del gen antigénico	50
Figura 16. Modelo 3D de la construcción de gen antigénico por I-TASSER	51
Figura 17. Esquema de la construcción de gen antigénico VanillaVax clonado en vector pET28a	52

Abreviaturas

CTL: Linfocito T Citotóxico.
FDA: Administración de alimentos y medicamentos.
HA: Hemaglutinina.
IAE: Encefalopatía asociada a influenza.
Jak1: Cinasa Jano 1.
M1: Proteína de matriz 1.
M2: Proteína de membrana 2.
MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.
NA: Neuraminidasa.
NEP: Proteína de exportación nuclear.
NK: Células asesinas naturales.
P.A.: Proteína antigénica.
pDC: Células dendríticas plasmocitoides.
RdRp: ARN polimerasa dependiente de ARN.
RE: Retículo endoplásmico.
SDRA: Síndrome de dificultad respiratoria aguda.
STAT: Activador de transcripción.
TH1: Linfocito colaborador tipo 1
TH2: Linfocito colaborador tipo 2
Tyk2: Tirosina cinasa 2.

Resumen

Análisis inmunológico de una proteína contra influenza A H1N1 producida en microalgas y diseño de una proteína antigénica contra influenza A H1N1 y A H3N2

El virus de la influenza tipo A causa infecciones y complicaciones respiratorias y ha protagonizado pandemias con un alto número de muertes. La vacunación es la herramienta fundamental para combatir la enfermedad y sus efectos a largo plazo. Debido a que el virus de la influenza tiene una alta tasa de variación génica, es necesario la actualización de vacunas cada año con base en las variantes circulantes. Se han implementado diferentes plataformas de fabricación de vacunas que son rentables con mejor rendimiento y de fácil acceso. En el presente trabajo se usó la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* como plataforma de producción de la proteína antigénica (P.A.), que contiene algunos epítomos relevantes del virus de la influenza A H1N1. La proteína recombinante P.A. se expresó en *E. coli* y también en *C. reinhardtii* por transformación nuclear y de cloroplasto. Se detectó P.A. de los extractos mediante SDS-PAGE y se corroboró por Western Blot. Se realizó una purificación de P.A. producida en *E. coli* mediante cromatografía de afinidad a níquel. La producción de P.A. en el núcleo de microalgas fue de 1.6748 mg por gramo de biomasa seca, en comparación con la de cloroplastos que fue de 1.3046 mg y fue utilizada junto con P.A. producida en *E. coli* BL21-Rosetta, para inmunizar ratones BALB/c. Se obtuvieron sueros de los ratones inmunizados y se detectó la producción de títulos de anticuerpos de tipo IgG después de la primera inmunización, y se encontró que los títulos disminuyeron después de la segunda inmunización. La producción de IgM fue similar al control de PBS y no se detectó producción de IgA. Hubo producción basal de IgE no cuantificable. En lavados traqueopulmonares hubo producción basal de IgG, y no se detectó en los lavados gastrointestinales. Por otra parte, se realizó la construcción de otro gen antigénico mejorado con los epítomos relevantes del virus de la influenza A H1N1 y A H3N2, mediante el uso de un análisis bioinformático, para la detección de las regiones conservadas y antigénicas, modelado en 3D y análisis de alergenicidad. Este análisis confirmó que la construcción teóricamente contiene epítomos que se presentan a MHC I y II, son conservados, y que tentativamente no generarían una reacción alérgica, además de contener regiones para un balance inmunitario Th1/Th2. En conclusión, la microalga *C. reinhardtii* puede producir proteínas recombinantes, pero es necesario probar posibles rutas de inmunización mixtas y un análisis de la dosis adecuada para una mejor respuesta inmunogénica en ratones.

PALABRAS CLAVE: influenza, proteína antigénica, microalga, anticuerpos neutralizantes.

Abstract

Immunological assay of a protein against influenza A H1N1 produced in microalgae and design of an antigenic protein against A H1N1 and A H3N2

The influenza type A virus causes infections and respiratory complications, and it has been at the center of pandemics with a high number of deaths. Vaccination is the fundamental tool to combat the disease and its long-term effects. Because the influenza virus has a high rate of genetic variation; it is necessary to update the vaccines every year based on the circulant variants. Different platforms for vaccine development have been implemented that are cost-effective with better performance and easy accessibility. In this work, we used the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* as a platform to produce the antigenic protein (P.A.), which harbors some relevant epitopes of the influenza A H1N1 virus. The recombinant protein P.A. was expressed in *E. coli* and in *C. reinhardtii* by nuclear and chloroplast transformation. Detection of P.A. was confirmed by SDS-PAGE and corroborated by Western Blot. A purification of P.A. produced in *E. coli* was performed by nickel affinity chromatography. The production of P.A. in microalgae nucleus was 1.6748 mg per gram of dry biomass, compared to that of chloroplasts, which was 1.3046 mg biomass, microalgae nucleus was a little higher than that expressed in chloroplast and was used together with P.A. produced in *E. coli* BL21-Rosetta to immunize BALB/c mice. Sera were obtained from immunized mice and production of IgG antibody titers was detected after the first immunization, but it was found that the titers decreased after the second immunization. IgM production was like the PBS control, and production of IgA was not detected. The production of IgE was basal unquantifiable. In tracheopulmonary lavages of the mice the production of IgG was basal, and it was not detected in gastrointestinal lavages. In other hand, the construction of another improved antigenic gene with the relevant epitopes of the influenza A virus H1N1 and H3N2 was performed, by means of the bioinformatic analysis for the detection of the conserved and antigenic regions, 3D modeling and allergenicity analysis. This analysis confirmed that the construct theoretically contains epitopes that are presented to MHC I and II, are conserved and that tentatively would not generate an allergenic reaction, in addition to containing regions for a Th1/Th2 immune balance. In conclusion, the microalga *C. reinhardtii* can produce recombinant proteins, but it is necessary to test possible mixed immunization routes plus an analysis of the appropriate dose for a better immunogenic response in mice.

KEYWORDS: influenza, antigenic protein, microalgae, neutralizing antibodies

1. INTRODUCCIÓN

La gripe causada por el virus de la influenza es una enfermedad respiratoria de alta relevancia clínica y hospitalaria, causante de pandemias debido a su capacidad de generar nuevas cepas constantemente. Esta enfermedad causó 50 millones de muertes con la influenza española en 1918-1919. Los virus de la influenza se caracterizan por presentar una evolución antigénica rápida, producto de mutaciones puntuales, recombinación y reordenamiento de los segmentos génicos, donde los genes que codifican a las glicoproteínas de membrana son los que presentan una mayor tasa de mutación. Al realizarse estos cambios, el virus tiene una alta capacidad de evadir el sistema inmunitario del hospedero, lo que promueve su constante prevalencia. Es por esta razón que las vacunas contra la influenza se deben actualizar cada año (Hyunsuh et al., 2018).

Según el informe de vigilancia epidemiológica en México, de la Dirección General de Epidemiología (DGE), durante la temporada de influenza estacional de la semana y año 40-2021 a la 01-2022, se confirmaron 1,261 casos positivos para influenza, donde el 89.8% fueron por influenza A H3N2, 6.7% por influenza A no subtipificable, 3.4% por influenza B y 0.1% por influenza A H1N1 de la pandemia del año 2009 (A H1N1 pmd09, pandémico 2009) (DGE, 2022). Entre el año 2010 a 2020 se reportaron en los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) en EE. UU., aumentos de 9 millones a 41 millones de casos por influenza y de 140,000 a 710,000 hospitalizaciones, así como de 12,000 a 52,000 muertes anuales (CDC, 2022).

También según el informe semanal epidemiológico actualizado por regiones, en América del Norte (que incluye a Canadá, EUA y México), de la semana y año 44-2022, se reportó un aumento moderado en la subregión con predominio de la influenza A H3N2, así también de influenza A H1N1 pdm09 e influenza B (OPS, 2023).

El virus de la influenza pertenece a la familia *Alfainfluenzavirus*, y los géneros A y B se relacionan con la generación de brotes epidemiológicos, sobre todo el tipo A conlleva a infecciones más severas (ICTV, 2021). Los virus de la influenza constan de un genoma de ARN de cadena negativa única dispuestos de ocho segmentos. Los principales segmentos que codifican para las glicoproteínas de superficie como hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), son las proteínas que juegan un papel esencial en la virulencia y patogénesis del virus (Javanian et al., 2021). La proteína de matriz 1 (M1) y proteína de membrana 2 (M2), se encargan del andamiaje, estabilidad estructural de la cápside viral y un splicing alternativo de la proteína M2 la cual tiene como producto la formación del canal iónico (Jilani et al., 2024).

La vacunación es la mejor forma para evitar la gravedad de esta enfermedad, y ha sido por excelencia una herramienta eficaz usada por la población en general. Los beneficios de la vacunación son la reducción de hospitalizaciones, la prevención de afecciones graves en personas con enfermedades crónicas, la continuidad laboral y escolar, y menor propagación del virus entre otras. En el caso de la vacuna contra la influenza existen diferentes tipos de vacunas, de las cuales las más comunes son las vacunas tetravalentes de virus atenuados producidas en embriones de huevo y vacunas tetravalentes recombinantes producidas en cultivos celulares (CDC, 2022).

La generación de vacunas recombinantes ha sido una tecnología de gran relevancia para la producción de proteínas antigénicas que combatan la enfermedad. Las ventajas de esta tecnología son el bajo costo de producción, mayor resistencia al almacenaje y transporte, la producción de inmunógenos es selectiva y se tiene menor probabilidad de generar efectos secundarios y respuestas alérgicas (Nowalk et al., 2024).

Es necesario desarrollar vacunas contra la influenza que protejan contra cepas y subtipos que circulen en la actualidad, para una mayor protección ante la infección. Para esto se pueden utilizar estrategias bioinformáticas que ayuden a mejorar la producción y generación vacunas, al analizar las secuencias conservadas de las cepas circulantes y después seleccionar las antigénicas y evitar regiones alérgicas. Además, se debe considerar incluir regiones adyuvantes que generen un mejor balance en las respuestas Th1 y Th2, ya que un desbalance en la respuesta Th2 puede exacerbar la enfermedad. El análisis *in silico* debe validarse *in vivo* y así determinar si es posible establecer una respuesta mediada tanto por anticuerpos como por linfocitos T citotóxicos. Para que exista un balance entre la respuesta Th1/Th2 es necesario que el antígeno genere una producción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias según el tipo de linfocito T cooperador, ya que Th1 se encarga de la respuesta celular y Th2 de la respuesta humoral, y el balance radica en la regulación de la respuesta proinflamatoria ante la administración de la vacuna (Leiva et al., 2023).

Una de las plataformas prometedoras para la producción de proteínas recombinantes con potencial para la producción de biofarmacéuticos, es *Chlamydomonas reinhardtii*. Esta microalga es un organismo unicelular mixotrófico

ovalado de 10 micrómetros de diámetro con dos flagelos para movilidad. La microalga contiene un cloroplasto que ocupa el 40% de la célula y varias mitocondrias. Su crecimiento es rápido y su ciclo sexual es corto. Además, se han implementado técnicas de transformación eficientes para los compartimentos nuclear y cloroplástico (Zhang, 2018). Debido a que *C. reinhardtii* se ha reconocido como seguro para su consumo (GRAS del acrónimo en inglés) y ha demostrado ser seguro para la salud, tener beneficios en el organismo y ser un excelente productor de proteínas recombinantes, se usó como plataforma para la producción de la proteína P.A.

2. ANTECEDENTES

2.1. Etiología y características del virus de la influenza

Los virus de la influenza constan de un genoma de ARN de cadena negativa única dispuestos de ocho segmentos (ICTV, 2021). En la Fig. 1 podemos apreciar a las proteínas de la superficie como hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). También se muestra la nucleoproteína viral (NP) la cual está unida a ARN; la proteína de matriz (M1) que ayuda a la estabilidad de la estructura del virión proporcionando un andamiaje; la proteína de membrana (M2), la cual es un canal iónico de protones; la proteína de exportación nuclear (NEP) que es un regulador del tráfico de los segmentos de ARN y la proteína no estructural (NS1) que es un factor de virulencia que reprime la respuesta inmunitaria de las células del hospedero (Krammer et al., 2018).

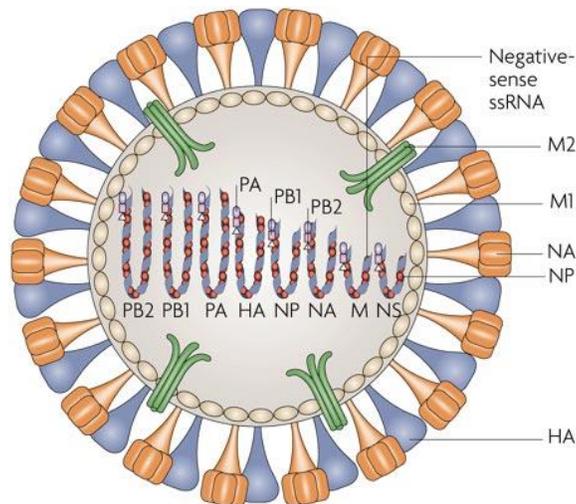


Figura 1. Estructura del virus de la influenza A. Consta de un genoma de ARN monocatenario de sentido negativo segmentado, proteínas de membrana como hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), la proteína de canal iónico (M2) y la que conforma la cápside (M1); segmentos de RNA polimerasa (PA, PB1 y PB2), proteína nuclear de exportación (NS) y nucleoproteína (NP) (Pérez & Fernández, 2023).

2.1.1. Tipos de virus de la influenza

Existen cuatro tipos de virus de la influenza denominados A, B, C y D. El virus de influenza tipo A es el causante de la mayoría de las epidemias, además se presenta con más frecuencia en las estaciones de invierno, y causa una enfermedad infecciosa más grave que afecta a humanos y animales (Javanian et al., 2021).

Los virus de la influenza que afectan a los humanos son A, B y C, mientras que el tipo D afecta mayormente a cerdos y vacas. Los tipos A y B han sido causantes de varios brotes, y sobre todo el tipo A de epidemias (Sameh & Hafner, 2023).

Los virus de influenza tipo A se clasifican según el tipo de glicoproteínas de superficie que son hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Se reconocen 16 variantes de HA y 9 variantes de NA, y las combinaciones de estas dos glicoproteínas de superficie conllevan a clasificación por subtipos (Javanian et al., 2021). El reservorio natural del tipo A son las aves acuáticas y los humanos. Los virus de influenza de tipo B se separan en dos linajes que son Yamagata y Victoria debido a los cambios en las glicoproteínas de hemaglutinina. Este tipo de virus solo circula en humanos (Tyrrell et al., 2021). El tipo B puede llegar a ser altamente contagioso y en algunos casos causar enfermedad grave y a pesar de ello, este es menos común durante las estaciones gripales. El virus de influenza de tipo C circula en humanos y también infecta a algunos animales como los cisnes, y causa infecciones más leves y los casos reportados son esporádicos. Los virus de influenza tipo D afectan en su mayoría a vacas y cerdos, y aún no se han encontrado casos que produzcan infección a humanos (Javanian et al., 2021).

2.1.2. Deriva y cambio antigénico

Los virus de la influenza conllevan una evolución antigénica frecuente por medio de mutaciones puntuales, recombinación y reordenamiento de los segmentos, principalmente en los genes que codifican para las glicoproteínas de superficie o de membrana. Al realizarse estos cambios se genera una alta capacidad de evadir el sistema inmunitario del hospedero, lo que causa enfermedad. Los mecanismos de evasión se conocen como la deriva antigénica y el cambio antigénico, los cuales no solo interfieren con la inmunidad natural, sino también con la vacunación (Hyunsuh et al., 2018). Estos dos mecanismos dan como consecuencia la producción de nuevas cepas circulantes (Ryt-Hansen et al., 2020).

Se puede definir la deriva antigénica como el proceso por el cual se realizan cambios por medio de mutaciones puntuales en el genoma del virus. Las mutaciones puntuales se introducen en el genoma viral durante el ciclo de replicación. Esto se debe a la ausencia de mecanismos virales para detectar y corregir mutaciones generadas durante este ciclo, por lo que las mutaciones son producidas por la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP). Las mutaciones en el ARN generan cambios en los epítomos de los virus, los cuales ya no son reconocidos por la respuesta inmunitaria del hospedero, lo cual impulsa la deriva antigénica (Kim et al., 2018).

Respecto a la deriva antigénica, algo que distingue al virus de la influenza es la sustitución frecuente de los virus más antiguos por las nuevas variantes modificadas. En las poblaciones con estas variantes antigénicas se ha demostrado que los virus de la influenza A (H1N1) y B co-circulan en periodos de más duración,

aunque el recambio es más frecuente en virus de la influenza A (H3N2) (Kim et al., 2018).

El cambio antigénico proviene del intercambio completo de genes, principalmente ocurre en la hemaglutinina (HA) y/o neuraminidasa (NA) y sucede dentro cepas de los virus de la influenza por sus extensos reservorios animales. Por ejemplo, en las células de tracto respiratorio del cerdo pueden converger dos cepas de virus de fuentes como aves y humanos, esta situación le permite realizar recombinación o reordenamiento de los segmentos virales y formar nuevos virus distintos antigénicamente. Los cambios antigénicos en el virus de la influenza que infecta a humanos dan como resultado una inmunidad limitada en la población, causando mayor transmisión y posibles brotes pandémicos (Kim et al., 2018). La influenza sigue siendo una enfermedad transmisible alrededor del mundo debido al cambio antigénico a pesar de la prevención con vacunación y medidas sanitarias y control de los casos (Petrie, 2016).

Debido a este proceso de co-evolución virus-hospedero, es necesario diseñar vacunas universales que contemplen regiones conservadas de diversas proteínas del virus y que puedan usarse por períodos largos a pesar de las modificaciones de ciertos epítomos, o en su defecto generar nuevas vacunas anualmente *ad hoc* a las variantes circulantes y así asegurar una respuesta inmune adecuada en la población (Kastenschmidt et al., 2023).

2.1.3. Ecología del virus de la influenza

La ecología viral se basa en la competencia adaptativa que permite la infección y mejoría en la transmisión a nuevos huéspedes. Entre la ecología y emergencia viral

está el estudio de la incidencia en propagación, patrones de nueva aparición de brote, infección de nuevos huéspedes y su relación demográfica y ambiental. Por lo general, los virus filogenéticamente relacionados son virus de importancia emergente, esto quiere decir, que los virus que tienden a crear brotes pandémicos tienen relación estrecha entre ellos. La capacidad evolutiva de estos virus está relacionada con su genoma de ARN, lo que permite mayores mutaciones e incluso mejorías adaptativas (Kreuder et al., 2015). Por lo anterior, la ecología viral nos permite determinar la probabilidad de nuevos brotes y expansión geográfica (Nuismer et al., 2022).

Los virus aviares tienen afinidad de unión a ácido siálico con enlaces α -2,3, pero los virus que afectan a humanos se unen a enlaces α -2,6, esto quiere decir, que mutaciones en HA permiten la unión entre diferentes huéspedes. Estas características permiten un escenario de origen-destino, y una amplificación a infectar diferentes especies (Lin et al., 2012).

2.1.4. Mecanismos de respuesta inmunitaria contra el virus de la influenza

La activación del estado antiviral de la célula hospedera es mayormente mediada por el sistema de interferón (IFN), que controla la infección viral por medio de la respuesta inmunitaria. La activación de las cascadas de señalización se lleva a cabo por el receptor IFN- α/β desencadenando la transcripción de genes que conllevan respuesta antiviral en la célula (Sengupta & Chattopadhyay, 2024). La activación de las cascadas de señalización se lleva a cabo mediante la fosforilación de la tirosina cinasa 2 (Tyk2) y la Janus cinasa 1 (Jak1), además de la fosforilación de transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT1 y STAT2).

También el complejo factor de transcripción del factor 3 del gen se estimula por interferón (ISGF3) y se hace con la combinación de STAT1 y STAT2, de tal forma que se obtiene un estado antiviral (Bahadoran et al., 2016). Las células dendríticas plasmocitoides (pDC) principalmente producen IFN α cuando hay una respuesta inmunitaria por infección viral (Lazova et al., 2022).

Los macrófagos alveolares se activan ante la primera fase de la infección viral de la influenza, y realizan un papel importante en la limitación de la propagación del virus, por ejemplo, llevan a cabo mecanismos antivirales como la opsonofagocitosis y la fagocitosis de células infectadas mediante apoptosis (Bahadoran et al., 2016). También es importante mencionar que ciertos signos patológicos causados por el virus de la influenza pueden ser producidos por efectos de la replicación del virus en el tejido, así como por la producción de citocinas inflamatorias como TNF- α , IL-1, IL-6 e IFN- α/β , producidas por macrófagos alveolares (Kim et al., 2008).

Las células asesinas naturales (NK) tienen un incremento en su actividad después de la infección viral. Los receptores NKp46 reconocen la proteína HA lo que produce la eliminación de las células hospederas infectadas (Luczo et al., 2021).

Las células dendríticas (CD) juegan un papel como mediadores para la presentación de antígenos, estas células realizan inspecciones en los pulmones en busca de patógenos extraños. En el caso de infección por virus de la influenza, las células dendríticas realizan dos mecanismos para resolver la infección: el primero consiste en degradar las proteínas del virus por proteasomas que se encuentran en el citosol, estos péptidos son transportados al retículo endoplasmático (RE) y son acarreadas en moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I

(MHC), que reconocen las células CD8+. El segundo mecanismo de obtención de antígenos es la fagocitosis de los virus o de las células en apoptosis (Bahadoran et al., 2016).

2.2. Gripe de la influenza A y su importancia

2.2.1. Sintomatología

La vía de entrada del virus de la influenza es a través del sistema respiratorio, conformado por nariz, boca, garganta y pulmones. El virus se propaga cuando la persona infectada estornuda, tose, habla o está en contacto con superficies contaminadas. Los signos y síntomas comunes de la influenza son tos, escalofríos, fatiga, fiebre, mialgia (especialmente en brazos, piernas y espalda), congestión nasal, faringitis, dolor general, diaforesis, dolor de cabeza (frontal o retro-orbital), debilidad y problemas para respirar. En niños y adultos mayores pueden presentar náuseas y vómitos, lo que puede llevar a una neumonía viral o una neumonía secundaria bacteriana y pueden presentar diarrea (Keilman, 2019).

Entre los primeros 3 a 4 días después de que los síntomas comienzan, es cuando la persona es más contagiosa. Aun así, las personas asintomáticas recién contagiadas, pueden infectar a otras personas antes de que se presenten los síntomas de la enfermedad. El periodo de contagio puede durar de entre 5 a 7 días y los síntomas pueden durar 2 semanas o más (Keilman, 2019).

2.2.2. Factores de riesgo

Existen varios factores que determinan si la enfermedad puede llegar a ser severa como lo son el padecer enfermedades crónicas tales como hipertensión, asma, diabetes, artritis reumatoide, enfermedades cardiovasculares, además de la dieta que determina una buena o mala nutrición (Gaitonde et al., 2019). Las personas que pueden presentar mayores complicaciones por este virus son los niños, adultos mayores, embarazadas y pacientes inmunocomprometidos (Keilman, 2019).

2.2.3. Complicaciones

La tormenta de citocinas inducida por el virus de la influenza puede causar síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), el cual consiste en cambios característicos de los alveolos que incluye trombosis capilar, necrosis focal y congestión de la pared alveolar, infiltración inflamatoria, formación de membrana hialina y edema pulmonar. Las tormentas de citocinas también pueden ocasionar influenza severa y causar la muerte. Los pacientes menores de 5 años hospitalizados con influenza tienen más probabilidad de desarrollar neumonía aguda, ya que en los pacientes más jóvenes se tiene un sistema inmune inmaduro por lo que es fácil desarrollar tormenta de citocinas menos controlada y más vigorosa. Además, la tormenta de citocinas afecta a adultos mayores de 65 años (Gu et al., 2020).

Durante la infección por el virus de la influenza, las personas con obesidad presentan mayor morbilidad y mortalidad, y tienen mayor riesgo de desarrollar infecciones secundarias por bacterias y SDRA (Gu et al., 2020).

Las complicaciones por el virus de la influenza pueden ser severas o incluso mortales en pacientes de riesgo alto y llegan a afectar cualquier órgano

manifestándose como enfermedad febril aguda con grados variables de síntomas sistémicos, además de los respiratorios (Javanian et al., 2021). Algunos de los órganos en los que se presentan las complicaciones más frecuentes son el corazón, el sistema nervioso central, entre otros (Krammer et al., 2018).

Según datos epidemiológicos, existen casos que indican que la infección por influenza también conlleva la participación de otros órganos además de los del sistema respiratorio. Esto puede ser debido a una patogenia viral única y/o factores que predisponen al hospedero (Sellers et al., 2017).

Una de las enfermedades extrapulmonares que se asocian más frecuentemente con influenza son las complicaciones cardiovasculares, esto se puede asociar a la superposición en la alta incidencia durante las temporadas invernales. Según los datos epidemiológicos hay un aumento de muertes por enfermedades cardiovasculares durante las epidemias de la influenza, así también por cardiopatía isquémica aguda y miocarditis aguda, que pueden contribuir a incrementar la morbilidad y mortalidad durante la infección por el virus de la influenza (Sellers et al., 2017). Por otro lado, las complicaciones neurológicas pueden presentarse por una infección por influenza, como la encefalitis o encefalopatía asociada a influenza (IAE, por sus siglas en inglés), síndrome posterior a la influenza, síndrome de Guillain-Barré (GBS, por sus siglas en inglés), síndrome de Reye y enfermedad de Parkinson.

2.2.4. Epidemiología

La última pandemia declarada por la OMS de la influenza A H1N1 fue el 11 de junio del 2009, que provocó defunciones aproximadamente de 575,400 personas

alrededor del mundo en el primer año de la pandemia. Entre este valor de defunciones se estima 201,200 por causas respiratorias y 83,300 por causas cardiovasculares (Dawood et al., 2012). Según la OMS, hay de 3 a 5 millones de casos graves causados por influenza y hay entre 290,000 a 650,000 defunciones al año alrededor del mundo (OMS, 2023).

Se analizó que había diferencias entre las secuencias en los virus de la influenza A H1N1 del año 1977 a 2009, debido a las variaciones antigénicas de mayor impacto (Dawood et al., 2009). En el caso de la influenza estacional en EUA, las temporadas con mayor tasa de circulación son entre otoño e invierno, el cuál va en aumento de casos, pero la mayor concentración de casos es entre diciembre y febrero (CDC, 2022).

Según estudios del año 2023, la Organización Panamericana de la Salud, reveló que se incrementó el número casos por influenza de las cepas tipo B/Victoria, tipo A(H1N1) pdm09 y tipo A(H3N2), en América Central, El Caribe y Brazil (Fig. 2) (OPS, 2023).



REGIONAL SUMMARY/RESUMEN REGIONAL

Influenza virus distribution in the last 4 EWs/Distribución de virus de influenza en las últimas 4 SE
Global

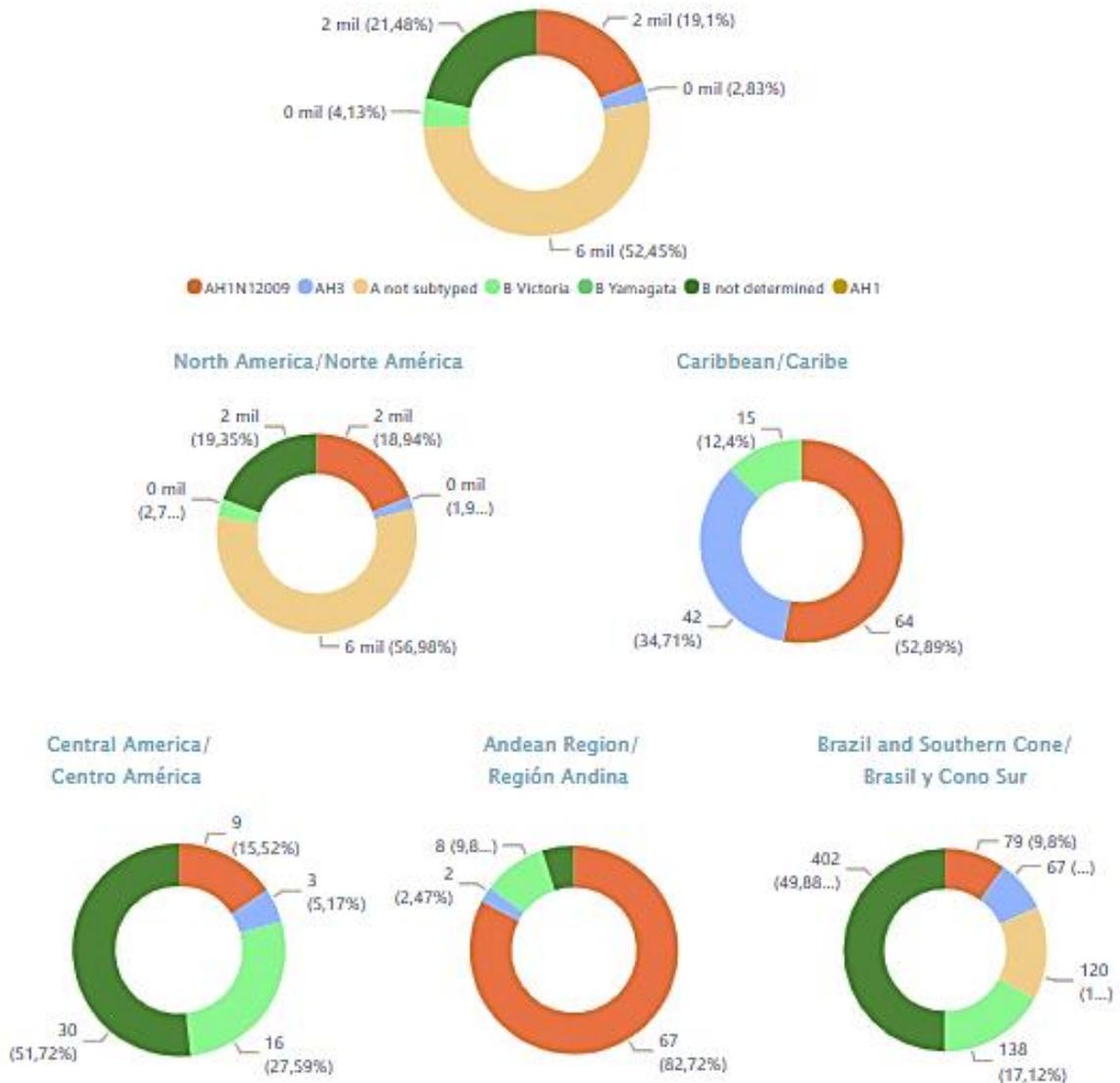


Figura 2. Distribución geográfica de la influenza y otras enfermedades respiratorias de la semana 45 del año 2023 (OMS, 2023).

En México, durante el invierno del 2021-2022, incrementaron los casos de influenza, a comparación del año previo. Esto debido a que las medidas para la reducción de infecciones respiratorias como la “sana distancia”, el uso de cubrebocas, higiene

frecuente de manos, ventilación para espacios cerrados y la suspensión de reuniones sociales, dejaron de realizarse con frecuencia, lo que provocó un incremento de casos en infecciones respiratorias.

2.3. Vacunas

La vacunación forma parte de la prevención primaria para la protección del individuo ante enfermedades infecciosas y aquellas que tienen potencial de brotes. Las vacunas activan el sistema inmunológico que produce anticuerpos neutralizantes para la protección ante futuros contactos con el agente patógeno. Cabe destacar, que la vacunación no exime de la transmisión ni la enfermedad, sino de un cuadro severo ante la misma, aunque también, recientemente se han enfocado los esfuerzos de los investigadores para generar vacunas que no permitan el ingreso del virus en la mucosa respiratoria. La vacunación contra la influenza reduce la incidencia y la saturación hospitalaria, muertes y gravedad de la enfermedad. Se recomienda la vacunación a la población después de los 6 meses de edad, y con una aplicación cada año durante las jornadas de vacunación (CDC, 2022).

Las propiedades de una vacuna ideal son las siguientes: pocos efectos secundarios, bajo costo de producción, técnica de administración simple, larga duración de la inmunidad efectiva, bajo riesgo para pacientes inmunocomprometidos, no tóxicas y “eco-friendly” (Blázquez et al., 2023).

2.3.1. Vacunas actuales contra la influenza

La actualización de las vacunas se realiza cada año según las cepas circulantes actuales. Las organizaciones encargadas del monitoreo de las enfermedades infecciosas y del suministro seguro de las vacunas son *Food And Drug Administration* (FDA), Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) y la Organización Mundial de la Salud (OMS). Para la temporada de vacunación contra la influenza del año 2023-24, el Comité Asesor de Vacunas y Productos Biológicos Relacionados (VRBPAC, siglas en inglés), realizó una junta para el análisis de la composición de la vacuna contra la influenza, relacionado con los datos epidemiológicos y la antigenicidad de los aislados virales obtenidos durante el año reciente (Tabla 1) (FDA, 2023).

Formulación	Método de producción	Cepas
Tetraivalente	Huevo embrionado	<ul style="list-style-type: none"> • A/Victoria/4897/2022 (H1N1) pdm09-like virus • A/Darwin/9/2021 (H3N2)-like virus; • B/Austria/1359417/2021-like virus (B/Victoria linaje) • B/Phuket/3073/2013-like virus (B/Yamagata linaje).
Tetraivalente	Cultivo celular o recombinantes	<ul style="list-style-type: none"> • A/Wisconsin/67/2022 (H1N1) pdm09-like virus. • A/Darwin/6/2021 (H3N2)-like virus. • B/Austria/1359417/2021-like virus (B/Victoria linaje) • B/Phuket/3073/2013-like virus (B/Yamagata linaje).
Trivalente	Huevo embrionado o cultivo celular o recombinantes	<ul style="list-style-type: none"> • A(H1N1) pdm09 • A(H3N2) • B/Austria/1359417/2021-like virus (B/Victoria linaje)

Tabla 1. Formulación de vacunas actuales contra el virus de la influenza año 2022-2023.

(FDA, 2023)

Según la Organización Mundial de la Salud, las empresas que generan las vacunas contra la influenza requieren aproximadamente 6 meses para su fabricación, esto acordado en la reunión que se lleva a cabo una vez al año durante el mes de marzo. En la reunión anual se toman en cuenta qué cepas se incluirán en las vacunas. Las vacunas de mayor distribución son las de virus inactivados producidas en huevos embrionados de pollo (CDC, 2024).

2.3.2. Proteínas recombinantes vacunales

Las proteínas recombinantes han sido una plataforma prometedora para la fabricación de vacunas contra virus infecciosos. La primera vacuna recombinante en circulación desde el año 1980 es la vacuna contra la hepatitis B, lo que llevó a la fabricación de nuevas vacunas contra virus respiratorios y de transmisión sexual, así mismo, vacunas en fase de desarrollo para enfermedades cancerígenas, alergias y autoinmunes. El fundamento de este tipo de vacunas se basa en la identificación de antígenos del patógeno, y al seleccionar epítomos antigénicos relevantes, estos puedan ser expresados y producidos en una plataforma que genere suficientes dosis, por ejemplo, bacterias, plantas, levaduras, etc. (Casas et al., 2024).

Las vacunas universales contemplan realizar un diseño antigénico con varias regiones conservadas de las proteínas de las variantes circulantes, actuales y de años atrás y de diferente región geográfica, lo cual en teoría puede generar una vacuna que pueda ser efectiva no solo en el año que se produce, sino que puede aplicarse en años posteriores.

2.4. Sistemas de expresión para producción de proteínas recombinantes

2.4.1. Bacterias

Según la historia, el primer tratamiento terapéutico recombinante para la diabetes fue la producción de la insulina en bacterias en 1982, esto revolucionó la forma de fabricación de medicamentos y vacunas, ofreciendo una nueva tecnología de producción masiva. Gracias a esto, se ha utilizado la bacteria *Escherichia coli* como sistema de expresión para producción de proteínas recombinantes, ya que, se conoce su genoma completo, su metabolismo, variedad de vectores de expresión sus condiciones de crecimiento no son estrictas y sus tiempos de producción son cortos. Los pasos en general para la producción de proteínas recombinantes en bacterias se basan en diseñar el vector, selección de la cepa que determinará la cantidad y eficiencia de la producción, medios de cultivo y técnica de purificación (Angulo et al., 2023). Para la optimización de las proteínas recombinantes es necesario considerar el uso de codones, estabilidad del mRNA, la traducción del mensajero y también la pureza de la proteína para eliminar posibles contaminantes de la bacteria (Kaur et al., 2018).

2.4.1.1. E. coli BL21

Las células *BL21* pertenecen a la cepa B de *E. coli*, no contienen las proteasas Lon y OmpT, y esto ayuda a la estabilidad de las proteínas y que no haya degradación. Cabe destacar, que al ser carente de endonucleasa RNAasa E, es más eficiente la transcripción de los genes (Kaur et al., 2018). Permite la expresión de la proteína

recombinante con la RNA polimerasa de T7 y sitio de unión a ribosoma (Padmanabhan et al., 2020).

2.4.1.2. *E. coli* BL21-Rossetta

Las cepas *Rossetta* de *E. coli* son derivados de la cepa *BL21*, esta cepa promueve la expresión de proteínas eucarióticas que suministra codones raros (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA) que corresponden al ARNt (Mohammad et al., 2018).

2.4.2. Plantas

Las plantas también son utilizadas como biofábricas de proteínas recombinantes, mediante diversas técnicas de transformación genética como estable o transitoria. Las ventajas de estos sistemas de expresión son su bajo costo y la cantidad de producción de biomasa. Un ejemplo es la planta *Nicotiana tabacum* que pertenece a la familia de las solanáceas, y puede transformarse su genoma fácilmente para expresar proteínas heterólogas y al usar el método transitorio se pueden obtener antes de la floración de la planta, lo que evita el flujo de polen (Menéndez et al., 2020). Existen proteínas producidas en plantas ya aprobadas por la FDA en 2012, para tratamientos en humanos, como la beta-glucoocerebrosidasa contra la enfermedad de Gaucher (PROTALIX, 2012). 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.

2.4.2.1. Vacunas comestibles

Otro método de administración efectiva son las vacunas comestibles, debido a su fácil acceso, menor coste y versatilidad. Las plantas han sido biofábricas de proteínas y biocombustibles para diversos intereses, ya que nos brindan mayor seguridad y mejor rendimiento por su biomasa. Las plantas pueden ser utilizadas para la producción de antígenos con fundamento vacunal, y por diversos métodos de biología molecular se insertan genes de interés (Blázquez et al., 2023).

Otro punto por destacar es que, para las vacunas de administración inyectable tradicionales, se necesita tener personal capacitado y certificado y la aplicación puede producir hematomas, inflamación o calentura después de administrarse. La vía de administración oral activa la inmunidad innata de las mucosas, que es la primera línea de defensa ante cualquier entrada al organismo, pero en la administración inyectable solo se promueve la inmunidad humoral.

El mecanismo de acción de las vacunas comestibles se basa en estimular la respuesta inmune de las mucosas digestivas, y también se activa la respuesta innata como adaptativa, el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) ayuda la producción de anticuerpos tipo IgA, que se relaciona a las secreciones externas, ya que existe un contacto directo de la proteína recombinante, además MALT está en el tracto gastrointestinal, nasofaringe, colon, recto, amígdalas palatinas y linguales, apéndice y el intestino delgado. Las inmunoglobulinas de tipo A bloquean principalmente a las proteínas de entrada del virus a la célula del hospedero. (Zainutdinov, 2022).

2.4.2.2. *Chlamydomonas reinhardtii*

También las microalgas han sido plataformas para la expresión de proteínas recombinantes, ya que pueden generar gran cantidad de biomasa en poco tiempo, y no contienen compuestos endógenos nocivos para el consumo humano (Ahmed et al., 2023).

El alga unicelular biflagelada *Chlamydomonas reinhardtii* presenta una morfología ovoide con diámetro de 10 µm, su reproducción es de manera sexual, se desarrolla de forma mixotrófica y es fotosintética. Posee un cloroplasto en forma de copa que ocupa el 40% de su espacio intracelular y contiene 80 copias genómicas.

Las ventajas de este sistema son su capacidad de escalabilidad ante la producción, rápido crecimiento en medios mínimos líquidos y sólidos, y gran cantidad de biomasa en poco espacio. Otra ventaja es que además de la producción de proteínas recombinantes, se ha usado para producir lípidos para biodiesel y producción de pigmentos por carotenoides (Nievergelt et al., 2023).

Algunos ejemplos del uso de *C. reinhardtii* es la producción de la proteína mCherry por medio de un cultivo semicontinuo para evaluar su productividad, lo que proporcionó buenos resultados de un aumento de hasta el 161% en su producción de la proteína en comparación con el sistema de cultivo en lotes (Arias, 2021).

También se han desarrollado biofármacos contra diferentes patologías utilizando como plataforma de expresión a *C. reinhardtii*, un ejemplo, es la vacuna contra la malaria expresada en cloroplasto, se administró vía oral en ratones con el fin de reducir la cantidad de los parásitos (Hempel & Maier, 2012). Otro ejemplo es la producción de una vacuna quimérica contra el virus del Zika, el cual obtuvo

respuestas humorales significativas mediante la administración subcutánea (Márquez et al., 2018). También se produjo una vacuna subcutánea contra el virus del papiloma humano, donde se expresó la oncoproteína E7 (un antígeno antitumoral) en cloroplasto y dio protección antitumoral en ratones de IgG anti-E7 específicas (Demurtas et al., 2013).

Como antecedente directo del presente proyecto, en nuestro grupo se produjo y evaluó el péptido antiviral contra influenza Entry Blocker (EB), expresado en *C. reinhardtii*, el cual demostró inhibir la unión entre la hemaglutinina y el receptor de la célula huésped (Reyes-Barrera, 2021).

2.4.2.3. Obtención de P.A. en *E. coli* BL21

En el trabajo de tesis de la Dra. Karen Reyes Barrera (Reyes-Barrera, 2021), determinó el peso molecular de la proteína antigénica P.A. en el programa “Protparam” (<http://web.expasy.org/protparam/>), el cual es 33.4 kDa. El peso molecular se confirmó mediante gel de electroforesis SDS-PAGE y Western Blot. En la Fig. 3 se muestran los extractos de proteínas totales P.A. de bacteria usado como control positivo, P. A. de algas transgénicas y alga no transformante como control negativo (Reyes-Barrera, 2021).

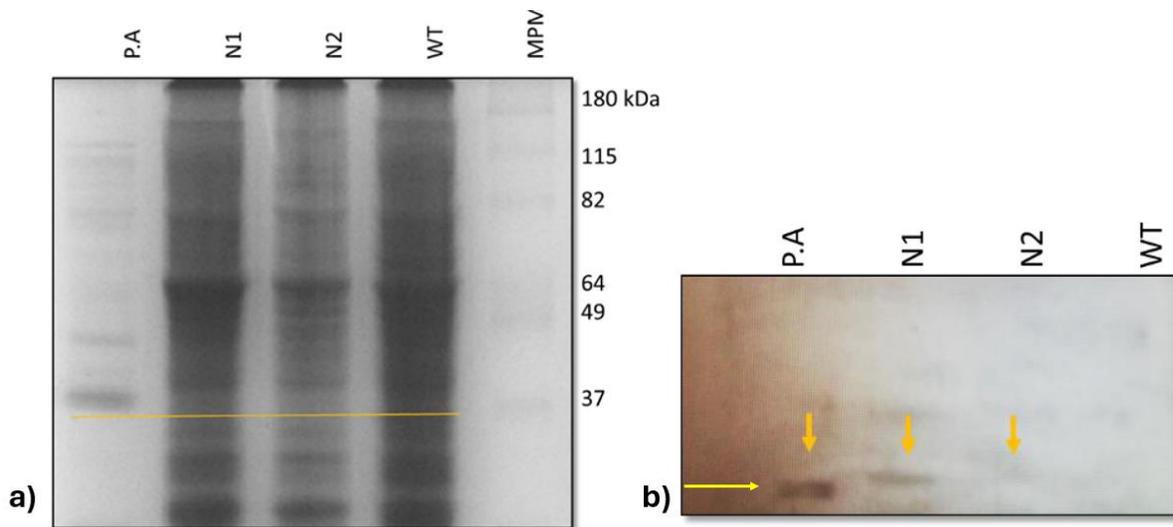


Figura 3. Determinación de P.A. en extractos de proteína total soluble de líneas transgénicas y no transgénicas. a) SDS-PAGE de P.A. producida en *E. coli*, líneas transgénicas de extractos de proteína soluble total (N1 y N2), línea no transformante (WT) y marcador de peso molecular (MPM). La línea amarilla determina la presencia de P. A. b) Western Blot de P.A. producida en *E. coli*, P.A. en extractos de proteína soluble total de líneas transgénicas (N1 y N2) y no transformante (WT), en las flechas hacia abajo amarillas determinan la presencia de P.A. (Reyes-Barrera, 2021).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Realizar la caracterización inmunológica de una proteína antigénica contra influenza A H1N1 expresada en *Chlamydomonas reinhardtii* y el desarrollo de un prototipo antigénico con epítopos relevantes de influenza A H1N1 y H3N2 e inmunomoduladores proteínicos para mejorar la respuesta Th1 y Th2.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Determinar la producción de la proteína antigénica en las líneas transformantes nucleares y transplastómicas de *C. reinhardtii*
- 2) Caracterizar la respuesta inmunitaria de la proteína antigénica expresada en microalgas a través de un ensayo de inmunización oral en ratones BALB/c.
- 3) Diseñar un gen sintético mediante análisis informático que contenga regiones conservadas y antigénicas de las cepas circulantes de influenza A H1N1 y H3N2, que sean putativamente inmunogénicas y no alergénicas, e incluir epítopos proteínicos que promueven el balance de la respuesta Th1 y Th2.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material y equipo

El material y equipo utilizado se encuentran en los anexos A y B.

4.2. Proteína antigénica (P.A.) producida en microalgas

4.2.1. Diseño y construcción de la proteína antigénica (P.A.)

A partir del análisis bioinformático reportado en la tesis de la Dra. Reyes-Barrera (Reyes-Barrera, 2021), se cuenta con una construcción con epítomos relevantes de las glicoproteínas y proteínas de membrana del virus de la influenza A H1N1, los cuales fueron hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), nucleoproteína (NP) y proteína de membrana 1 (M1) y 2 (M2) (Reyes-Barrera, 2021). Por medio de la base de datos Influenza Research Database (<http://www.fludb.org/brc/home.spg?decorator=influenza>), se seleccionaron las secuencias aminoacídicas de HA, NA, NP, M1 y M2. Después se realizó una alineación de las secuencias seleccionadas para la elección de epítomos conservados por medio del software MEGA 6.06 (<http://www.megasoftware.net/>). Los análisis de reconocimiento a MHC I y II se realizaron en los servidores web SYFPEITHI (Rammensee et al., 1999) y Propred (Kwon et al., 2024). El análisis de antigenicidad se realizó en el servidor web AntheProt 6.6.6. (<http://antheprot-pbil.ibcp.fr/>). Se seleccionaron 15 epítomos antigénicos y que se presentaban al MHC de clase I y II. Estos epítomos se enlazaron mediante espaciadores de prolina y glicinas (GPGPG) que exponen los epítomos. Para la expresión nuclear en *C. reinhardtii* al gen codificante de la P.A., se le añadió un péptido señal, sitio de corte

de proteasa, etiqueta de histidina y una secuencia KDEL, la cual retiene a la proteína en el retículo endoplásmico. Además, fue clonado en vector pChlamy_1 (Figs. 4 a y c). Para la construcción del gen P.A. para la expresión en cloroplastos, se le añadieron sitios de unión a ribosoma, sitios de corte de proteasa y etiqueta de histidinas, y se clonó en vector p463 (Figs. 4 b y d) (Reyes-Barrera, 2021).

a.- Proteína antigénica para la expresión nuclear



b.- Proteína antigénica para la expresión en cloroplasto

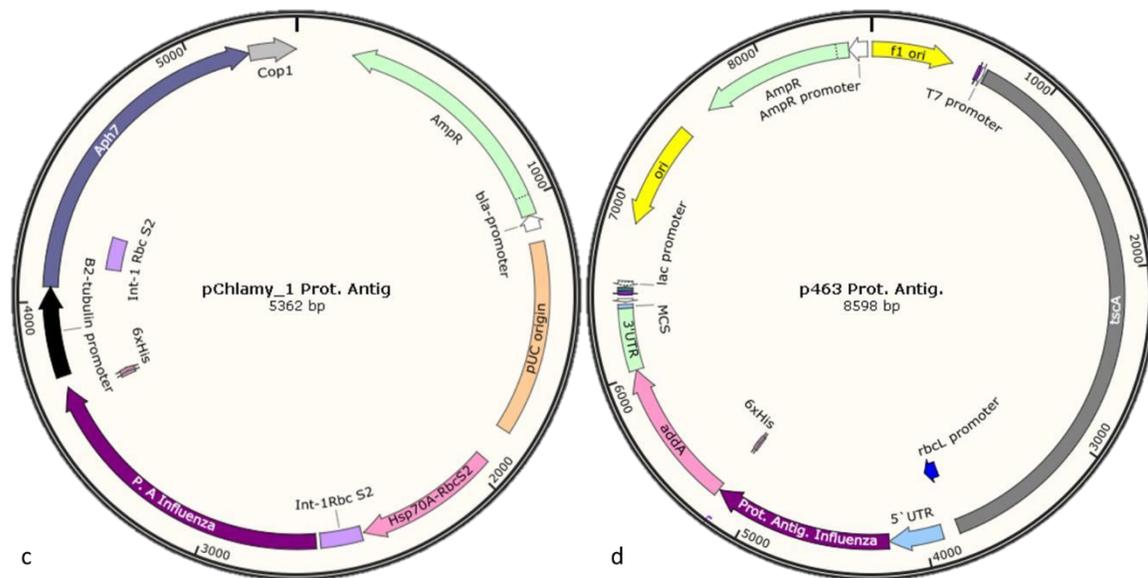
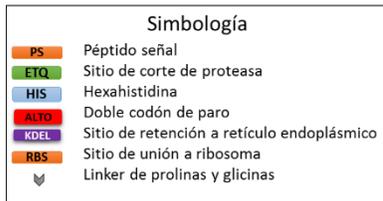


Figura 4. Diseño de la proteína antigénica contra influenza A H1N1 a expresarse en microalgas. Diseño de los péptidos para la expresión nuclear y en cloroplastos en *Chlamydomonas reinhardtii*; a) Proteína antigénica P.A., para la expresión nuclear contiene los sitios de restricción *KpnI* y *XbaI* para clonarse en el vector pChlamy_1; b) Proteína antigénica P.A. para la expresión en cloroplasto contiene los sitios *NcoI* para clonarse en el vector p463. Diagrama de los vectores de expresión nuclear y en cloroplastos; c) El gen de la proteína antigénica se

encuentra clonado bajo el promotor Hsp70A-RbcS2 y el intrón 1Rbc S2 en el vector pChlamy_1; d) El gen de la proteína antigénica está clonado como bicistrón con el gen addA en el vector p463.

4.2.2. Transformación de P.A. en microalgas *C. reinhardtii*

Para las transformaciones en microalga se utilizó la cepa CC-137 mt (+) de *C. reinhardtii*. La transformación en núcleo de microalga se hizo en *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 y se usó antibiótico de selección en medio TAP (Tris-Acetato-Fosfato pH=7) con higromicina a 15 mg/L. La transformación de cloroplasto se llevó a cabo por el método de biobalística y el antibiótico de selección en medio TAP fue espectinomomicina a 100 mg/L (Reyes-Barrera, 2021).

4.2.3. Medio de cultivo y condiciones de crecimiento para *Chlamydomonas reinhardtii*

El medio de cultivo para el crecimiento de las microalgas fue en medio Tris-Acetato-Fosfato (TAP) sólido (15 g de agar bacteriológico/L) con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad a 23°C, para el mantenimiento de las microalgas transformantes se resiembra cada 15 días. Para la producción de biomasa microalgal, se creció un preinóculo en medio TAP líquido, en agitación constante de 145 rpm con las mismas condiciones de luz, oscuridad y temperatura mencionadas anteriormente. Después se ajustó el inóculo a una longitud de onda de 700 nm y se creció hasta una densidad óptica de 0.05 y se cultivó por 5 días.

4.2.4. Producción de biomasa algal transformada y no transformada

Para producir biomasa algal transformada y no transformada para el ensayo de inmunización oral en ratones BALB/c, se crecieron líneas transformantes de microalga nuclear y cloroplasto y la línea no transformada, en medio TAP líquido a pH=7 más higromicina (15 mg/L) para la transformación nuclear y espectinomomicina (100 mg/L) para la de cloroplasto, en agitación constante a 145 rpm a 23°C con un fotoperiodo de 18 h luz y 8 h oscuridad por 4-5 días. Los cultivos se centrifugaron a 4,000 rpm por 10 min y se recuperó la biomasa en tubos Falcon de 50 mL estériles para su posterior liofilización.

4.2.5. Extracción de proteínas solubles e insolubles de biomasa microalgal transformada

La biomasa seca se colectó de la línea transgénica nuclear (N), la línea transplastómica de cloroplasto 3 (C3) y línea no transformada silvestre [Wild Type (WT)]. Las células fueron resuspendidas en un buffer de extracción de proteínas solubles (Tris-HCl 50mM pH=8, NaCl 50 mM, Tween 20 0.2% y de coctel de inhibidores de proteasas 0.1%). Posteriormente se sonicó a una amplitud de 30% y 4 pulsos de 15 s ON/OFF por 1.5 min, después se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min a 4°C. A continuación, se transfirió en sobrenadante a un tubo nuevo (fracción soluble).

Para la obtención de la fracción insoluble se disolvió la pastilla o *pellet* restante con buffer de urea (urea 8M, Tris-HCl 50mM pH=8, NaCl 50mM, Tween 20 0.2% y de coctel de inhibidores de proteasas 0.1%), se dejó agitando por 12 h a 4°C por rotación. Después se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min a 4°C, y se pasó el

sobrenadante a un tubo nuevo (fracción insoluble). Se guardaron los extractos a -20°C.

4.2.6. Cuantificación de proteínas solubles e insolubles en extractos de microalgas

Se realizó un ensayo de cuantificación de concentración de proteínas totales por método de Bradford. Se realizó una curva patrón con BSA (suero fetal bovino) a concentraciones de 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62.5 µg/mL, 31.25 µg/mL, 15.625 µg/mL, 7.81 µg/mL y 0 µg/mL. Se añadieron 10 µL de cada dilución a diferentes pozos por triplicado. Después, en pozos adjuntos se añadieron 10 µL de muestra de las fracciones solubles e insolubles nuclear, cloroplasto línea 3 y no transformada. Una vez añadidas la curva y las muestras por triplicado, se adicionó 190µL de reactivo de Bradford y se hizo una lectura de la placa a 595 nm en el espectrofotómetro GloMax®-Multi+ Microplate Multimode Reader con Instinct® (Promega Corporation, Madison, WI, USA).

La cuantificación y detección de P.A. se realizó mediante inmunoensayo de ELISA indirecto en proteína total soluble e insoluble de los extractos de microalga transformada y no transformada. Para la adhesión de las proteínas a la placa de poliestileno se usó buffer de carbonatos y se incluyó una curva estándar de diluciones seriadas y blanco, todo por triplicado. Se incubó la placa a 4°C durante 14 horas. Los lavados se realizaron con buffer TBS-T (Tris-HCl pH=7.5, NaCl 0.9%, Tween 20 0.05%). Como anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo policlonal anti-P.A., este producido por la Dra. Reyes Barrera en ratonas BALB/c, por administración de P.A. vía intramuscular (lote 2 a una dilución a 1:1,000). Como

anticuerpo secundario anti-IgG mouse unido a fosfatasa alcalina a una dilución de 1:3,000. El revelado de la placa se realizó con 3 mM de p-nitrofenilfosfato y se midió la absorbancia de la placa a 415 nm en el espectrofotómetro GloMax®-Multi+ Microplate Multimode Reader with Instinct® (Promega Corporation, Madison, WI, USA).

Los resultados de la cuantificación de P.A. en microalgas transformantes y no transformante se procesaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía en el programa GraphPad Prism versión 9.4.1. Así mismo, se hizo prueba de comparaciones medias de TUKEY. Después con los datos obtenidos de los ensayos por Bradford y ELISA indirecto de los extractos de microalgas se realizaron cálculos de producción de miligramos de P.A. por gramo de biomasa seca.

4.3. Producción de la proteína antigénica (P.A) en *E. coli*

4.3.1. Expresión de P.A. en *E. coli*

Se decidió producir la proteína P.A en *E. coli* para tenerla como control de inmunización. La construcción del gen P.A. optimizado para *E. coli* se clonó en el vector de expresión pET-28b. El gen se comprobó por medio de la técnica de PCR y secuenciación, después se realizó la transformación del gen en *E. coli BL21* (Reyes-Barrera, 2021).

4.3.2. Obtención de P.A. en *E. coli BL21*

Se creció un cultivo de *E. coli BL21* transformada con el plásmido pET-28b que contiene P.A., en medio LB (Luria-Bertani) con kanamicina (50 µg/mL) por 12 h a

37°C en agitación constante de 120 rpm. Después se dejó crecer 500 mL del inóculo hasta una densidad óptica de entre 0.5-0.7. Se indujo con 1 mM de IPTG y se incubó por 3 h a 28°C en agitación constante. Después se centrifugó el cultivo a 10,000 rpm por 10 min a 4°C en centrifuga AVANTI para la colecta de biomasa. Se resuspendió el material insoluble en 10 mL de hidrocloreuro de guanidina CH_6CIN_3 6 M pH= 7.8, NaCl 500 mM y Tris 50 mM, se mantuvo 24 h en agitación constante a 4°C. Después se centrifugó la muestra a 13,000 rpm por 10 min, y el sobrenadante se pasó a la columna de níquel, el cual se dejó en incubación por 2 h en agitación constante. Se realizó el método de purificación híbrida del sistema ProBond™ (No. Cat. K85001 Thermo Fisher Scientific) y se realizaron lavados con imidazol a concentración de 10 mM, 50 mM y 250 mM. Posteriormente, se hizo un ensayo de cuantificación de proteínas totales por medio del método de Bradford, y un gel para la visualización de proteínas y la calidad de las muestras en SDS-PAGE (Reyes-Barrera, 2021). Para la detección de P.A. se realizó un Western Blot con el equipo *Trans Blot Turbo Transfer System*. Para la concentración de la proteína, se transfirió la muestra a un tubo VivaSpin® de 10 kDa con membrana PES, con ayuda del buffer (PBS, 5% glicerol). Se realizó un inmunoensayo de ELISA indirecto para la cuantificación proteica de P.A. donde se usó como anticuerpo primario anti-P.A. 1:2,000 y un anticuerpo secundario anti-IgG mouse unido a fosfatasa alcalina 1:5,000, después para el revelado se usó 100 µL de p-nitrofenilfosfato 3 mM y se leyó después de 30 min de incubación a 405 nm.

4.3.3. Curva estándar de P.A. producida en *E. coli* BL21

En la estandarización del ELISA indirecto para la cuantificación de P.A. para la realización de una curva estándar control se utilizó buffer de carbonatos con P.A. concentrado (50 µg/mL) para la unión a placa realizando las siguientes diluciones 125 ng/µL, 62.5 ng/µL, 31.25 ng/µL, 15.62 ng/µL, 7.81 ng/µL, 3.9 ng/µL, 1.95 ng/µL y 0 ng/µL, se incubó por 14 h a 4°C. Se realizaron 3 lavados con buffer TBS-T. Se adicionó buffer BBS para bloqueo y dilución. Se utilizó anti-P.A. como anticuerpo primario a una dilución a 1:1,000 y anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina a una dilución a 1:3,000. Se reveló con buffer de revelado con p-Nitrofenil fosfato y se leyó la placa a los 30 min de reacción a 415 nm en el espectrómetro GloMax®-Multi+ Microplate Multimode Reader with Instinct® (Promega Corporation, Madison, WI, USA).

4.3.4. Purificación por método desnaturalizante de P.A. producida en *E. coli* Rosetta

Debido a que se requería una mayor cantidad de la proteína P.A. ensayo de inmunización en ratones (10 µg por ratón), se estableció una nueva estrategia de purificación de proteína P.A. Primeramente, se creció un preinóculo de 200 mL con medio LB (Luria-Bertani) y un asada de la bacteria transformada, se dejó incubar por 12 horas a 37°C en agitación constante de 120 rpm. Después, se hizo un inóculo con medio LB y kanamicina (50 µg/mL), que se dejó crecer hasta una densidad óptica de 0.5-0.7 (600 nm). También, se indujo con IPTG 1 mM y se incubó por 3 horas a 28°C en agitación constante. La biomasa se colectó por centrifugación a 10,000 rpm por 10 min a 4°C en centrifuga marca *AVANTI J-301* y se transfirió la

biomasa a un tubo Falcon de 50 mL. Se añadió 50 mL de buffer A (NaH₂PO₄ 1M, Tris-HCl 0.1M, Hidrocloruro de Guanidina 1M, pH=8), se mezcló y sonicó a 50% amplitud en 20 pulsos de 10 s ON y 50 s OFF. Después, se centrifugó la muestra a 13,000 rpm por 20 min, el sobrenadante se transfirió a otro tubo Falcon de 50 mL. La purificación se realizó de acuerdo con el método por afinidad de perlas de níquel a proteínas recombinantes que contienen polihistidinas (6xHis), esto con el sistema de purificación *Invitrogen™ ProBond™ Nickel-Chelating Resin*. Se hicieron lavados con buffer de lavado (NaH₂PO₄ 1M, Tris-HCl 0.1M, Urea 8M, pH=6.5), buffer de elución a pH=5, pH=4 y pH=3, y lavados con imidazol a 10 mM, 50 mM y 100 mM. Se realizó cuantificación de la concentración de proteínas insolubles totales por método de Bradford y para la visualización de proteínas totales se realizó un gel SDS-PAGE. Posteriormente, se hizo un pool de las fracciones para concentrar P.A. por medio de tubo centrífugo *VivaSpin®* de 10 kDa de membrana tipo PES, se realizó la cuantificación de proteínas por método de Bradford, un gel SDS-PAGE para la visualización de la calidad de la purificación, y un Western Blot con anti-P.A. 1:2,000 como anticuerpo primario, anti-IgG mouse 1:2,000 como anticuerpo secundario y para revelado se usó sustrato de fosfatasa.

4.4. Inmunización en ratonas BALB/c

4.4.1. Condiciones de mantenimiento de ratonas BALB/c

El protocolo para ensayo de inmunización fue aprobado por el comité de bioética para el cuidado y manejo de animales para la investigación del IPICYT, con número de folio 8. Para el experimento de inmunización oral e intramuscular se utilizaron

ratones hembra de la cepa BALB/c de entre 5 a 6 semanas de edad obtenidas en el Banco Genético del Bioterio del Instituto Nacional de Salud Pública de Cuernavaca, Morelos. Las condiciones de alojamiento se mantuvieron con ciclos de control de luz oscuridad 12h/12h, macroambiente controlado a temperatura de entre 20-25°C, humedad relativa entre 40% a 70%, en cajas de policarbonato con tapas, cama de olote, alimento para murinos (nutricubos), bebederos y agua potable estéril. La densidad fue de 6 ratonas por caja en el equipo de alojamiento para murinos de experimentación ALLENTOWN con filtros HEPA.

4.4.2. Inmunizaciones

Los grupos experimentales fueron los siguientes: Grupo 1 (n=6) P.A. liofilizada expresada en núcleo de microalga y usando buffer PBS (buffer fosfato salino, pH= 7.3) como vehículo para administración vía oral; grupo 2 (n=6) P.A. liofilizada expresada en cloroplasto de microalga y usando buffer PBS para administración vía oral; grupo 3 (n=6) microalga no transformada Wild Type (WT) usando buffer PBS para administración vía oral; grupo 4 (n=6) P.A. expresada en *E. coli* usando buffer PBS para administración vía oral; grupo 5 (n=6) buffer PBS para administración vía oral; grupo 6 (n=6) vacuna comercial *Fluzactal*® *Tetra* + buffer PBS para administración vía oral; y grupo 7 (n=6) vacuna comercial *Fluzactal*® *Tetra* + buffer PBS para administración vía intramuscular. La dosificación de la proteína P.A. fue de 10 µg y de la proteína de la vacuna comercial *Fluzactal*® *Tetra* fue de 1.5 µg de HA. El volumen de dosis por ratón fue de 100 µL. Las inmunizaciones se realizaron cada 15 días en total se realizaron 3 administraciones por grupo. La primera sangría se realizó previo a la inmunización mediante punción (50 a 200 µL de sangre por

ratón), la segunda sangría fue tomada 7 días después de la primera inmunización y la tercera sangría se tomó 7 días posterior a la segunda inmunización. Se realizó pool de sueros de las ratonas por grupo, según fecha de sangrado, para determinar el título de anticuerpos producidos.

La eutanasia de las ratonas se realizó 52 días después a la primera inmunización con una solución de Ketamina (200 mg/Kg de peso) /Xilacina (10 mg/Kg de peso) por inyección letal vía intraperitoneal y se hizo la colecta de la cosecha total de sangre por ratón (800 μ L). Adicionalmente se colectaron los lavados intestinales y traqueopulmonares.

4.4.3. Determinación y cuantificación de anticuerpos policlonales

Con los diferentes lotes de plasma obtenidos de las ratonas BALB/c inmunizadas, se determinaron los anticuerpos contra P.A. mediante ELISA indirecto. Se determinó IgG, IgA, IgM e IgE totales en pools: lote 1 (sueros preinmunización), lote 2 (sueros primera inmunización), lote 3 (sueros segunda inmunización), lote 4 (sueros tercera inmunización) y lote 5 (sueros de cosecha). Se sensibilizó la placa a 200 ng de P.A. y se incubó con buffer de carbonatos por aproximadamente 14 horas, se bloqueó y diluyó con leche descremada al 6% + TBS-T (Tris-HCl 100 mM, NaCl 0.9%, Tween 20 0.05%, pH=7.5), la dilución del anticuerpo primario anti-P.A. fue de 1:500. Se caracterizó con anticuerpos secundarios IgG (1:4,000), IgA (1:2,500), IgM (1:1,000) e IgE (1:2,000) acoplado a fosfatasa alcalina y se reveló con p-Nitrofenilfosfato. De la misma manera, se cuantificaron anticuerpos de los lavados traqueopulmonares e intestinales a dilución 1:500.

El análisis bioestadístico de las absorbancias obtenidas en los ELISAs se realizó mediante el programa GraphPad Prism 7.

4.5. Diseño y construcción de Proteína Antigénica Mejorada (P.A.M.) contra el virus de la Influenza A H1N1 y H3N2

4.5.1. Diseño bioinformático de la proteína antigénica mejorada

Debido a que recientemente se han detectado muchos casos de la cepa de influenza A H2N3 y a que se ha puesto especial interés en incluir adyuvantes dentro de los genes sintéticos, decidimos mejorar la proteína antigénica con que realizamos los experimentos en ratones. Para obtener una vacuna actualizada con epítomos relevantes y conservados contra el virus de la influenza A H1N1 y A H3N2, se realizó un análisis bioinformático para la obtención de secuencias antigénicas y conservadas, que se reconocen por el MHC de clase I y II. En las bases de datos Fludb (Influenza Reseach Database) y NCBI Flu Database Influenza Virus Resource, se seleccionaron las secuencias de aminoácidos de las glicoproteínas y proteínas de membrana con un criterio de búsqueda de: fecha de recolección del año 2009 al 2022; zonas geográficas que son México, EUA, Europa y Asia; como huésped el humano; tipo de influenza A; subtipo H1N1: hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), proteína de membrana (M1) y proteína de membrana 2 (M2); subtipo H3N2: HA; y selección de secuencias completas de cada segmento genómico. Se alinearon las secuencias en el software MEGA.11 con el complemento MUSCLE, con selección de sitios altamente conservados al 100% (según la recomendación del programa).

Para la predicción de epítomos y análisis de secuencias antigénicas conservadas se utilizaron los servidores BepiPred-2.0 y SYFPEITHI. Se seleccionaron los epítomos que cumplieron con la mayor cantidad de características de criterios de elección: regiones altamente conservadas, altamente expuestas a reconocimiento por MHC I y II, regiones con particularidad en la estructura con base en el reconocimiento. Se enlazaron los epítomos con espaciadores de prolina y glicinas (Rastogi, 2024). Se incluyó un adyuvante proteico RS09 un péptido sintético capaz de unirse a TLR4 (Xu et al., 2024). También se incluyó la unión de un segmento de la proteína G que pertenece al virus sincicial (VSR) con la proteína quimera (F/M) del virus de sarampión, que es capaz de inducir producción de anticuerpos y un adecuado balance entre la respuesta inmune Th1/Th2. También al final de los epítomos se adicionó un corte de proteasa (PPS), cola de histidinas y codón de paro.

Se hizo un análisis de alergenicidad de la construcción mediante servidor web AllerTOPv 2.0. Se realizó un modelado 3D *in silico* de la construcción del gen antigénico por el servidor web I-TASSER y se visualizó la estructura tridimensional en Chimera X versión 1.3. Se le adicionaron al gen antigénico los sitios de restricción *NcoI* y *NotI* para clonarse en el vector de expresión pET28 b (+) en bacterias. Los genes se optimizaron para el uso de codones en el servidor *web IDT* codon optimization tool para *E. coli*, el cual se usó la plataforma de Expasy para traducir la secuencia de nucleótidos optimizada para bacterias y asegurar que se diseñó la construcción completa. Se mandó a sintetizar la construcción antigénica a GenScript (Fig. 5).

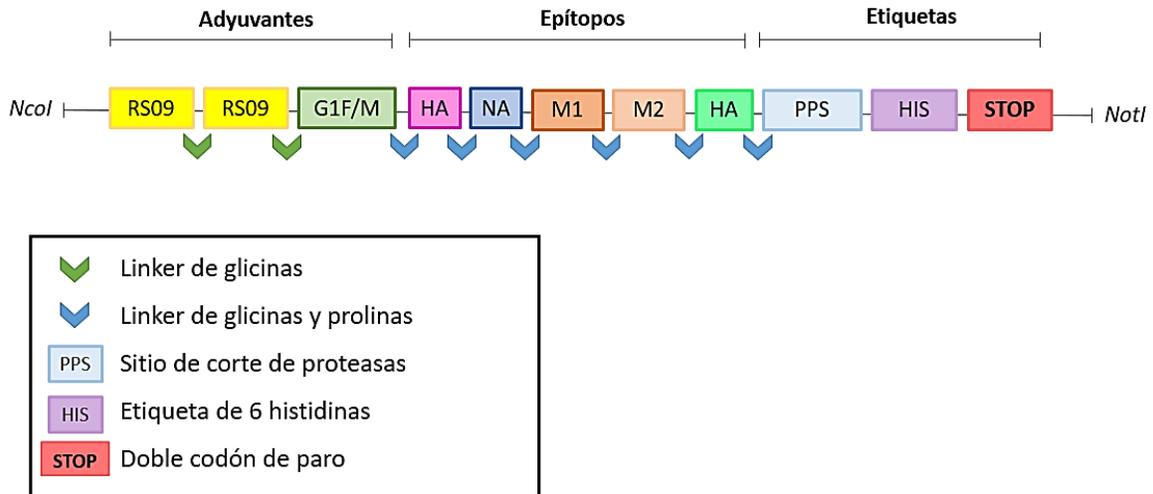


Figura 5. Construcción del gen antigénico mejorado (VanillaVax) contra la influenza A H1N1 y A H3N2. Diseño del gen antigénico contra influenza para su expresión en *E. coli*. Recuadros de HA (rosa), NA (azul), M1 (naranja) y M2 (naranja claro), pertenecen a la cepa de H1N1; y el recuadro HA (verde) pertenece a la cepa H3N2.

5. RESULTADOS

5.1. Proteína antigénica (P.A.)

5.1.1. Estandarización de la curva estándar para cuantificación de P.A. transformada

En ensayos previos se determinó que la mayor cantidad de proteína bacteriana se encuentra en la fracción de la proteína insoluble total, la cual se solubiliza con hidrocloreuro de guanidina 6 M (Reyes-Barrera, 2021). Se realizó entonces la inducción y purificación en columna de níquel eluyendo con imidazol. En la Fig. 6 se muestra un gel de proteínas SDS-PAGE, donde se observan bandas derivadas de eluciones cercanas al peso molecular estimado de P.A. (34 kDa). En trabajos previos en nuestro grupo hemos visto que algunas proteínas separadas por espaciadores de glicina o prolina pueden dar estructuras que migran a pesos mayores que los esperados, y probablemente por eso observamos otra banda, pero solo si secuenciamos cada banda sabremos a que corresponde cada una. Otra posibilidad es que la banda inferior sea un producto de degradación, lo cual se observó en un trabajo de una integrante de nuestro grupo realizado en Fraunhofer USA, donde pudo secuenciar ambas bandas. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular (MPM) y los carriles 2 y 3 corresponden a las eluciones con imidazol a 50 mM y 100 mM respectivamente. Se seleccionaron estas dos muestras para la realización de la curva estándar de P.A. para el establecimiento del ELISA indirecto.

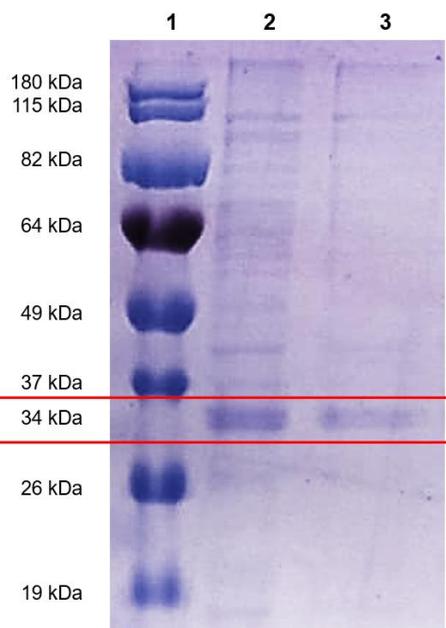


Figura 3. Gel SDS-PAGE de P.A. en *E. coli* BL21. Carril 1 corresponde al marcador de peso molecular, carril 2 elución 1 proteína P.A. y carril 3 elución 2 proteína P.A.

Aunque en el carril 2 se ve mayor cantidad de proteína, que en el 3 (la segunda elución), en el carril 3 se logran eliminar otras proteínas inespecíficas.

Con esta P.A. bacteriana se realizó la curva estándar para luego estimar la concentración de la proteína P.A. en microalgas. Para ello se usó el anticuerpo de P.A. obtenido en plasma de ratones inmunizados de un ensayo previo realizado por la Dra. Reyes Barrera, a una dilución a 1:1,000 por método de ELISA indirecto, el cuál demostró un ajuste de $R^2=0.9633$ para la regresión lineal de la curva estándar. La ecuación de la línea recta nos ayuda a obtener por interpolación la masa/volumen dada la absorbancia en las muestras (Fig. 7).

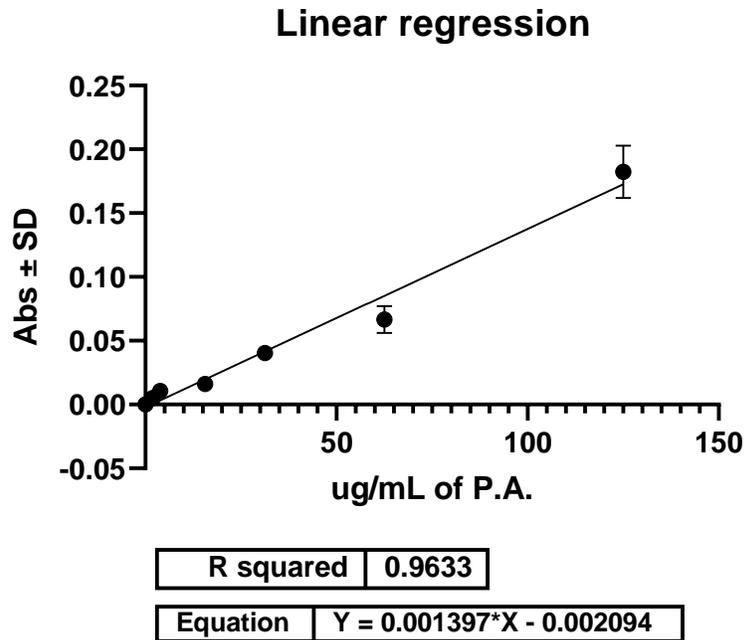


Figura 4. Curva estándar con P.A. purificada en *E. coli*. Gráfica de regresión lineal de P.A. mediante ELISA indirecto, el cual se muestra el valor de R^2 y ecuación de la línea recta.

5.1.2. Purificación de P.A. en *E. coli Rossetta*

Para la obtención de mayor cantidad de proteína P.A. se realizó una purificación por método desnaturalizante mencionando en la sección 4.3.4. El análisis por Bradford indicó una concentración de P.A. de 417.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y la purificación de la proteína se verificó por SDS-PAGE y Western Blot con anticuerpo primario anti-P.A. de suero de ratonas BALB/c (Fig. 8).

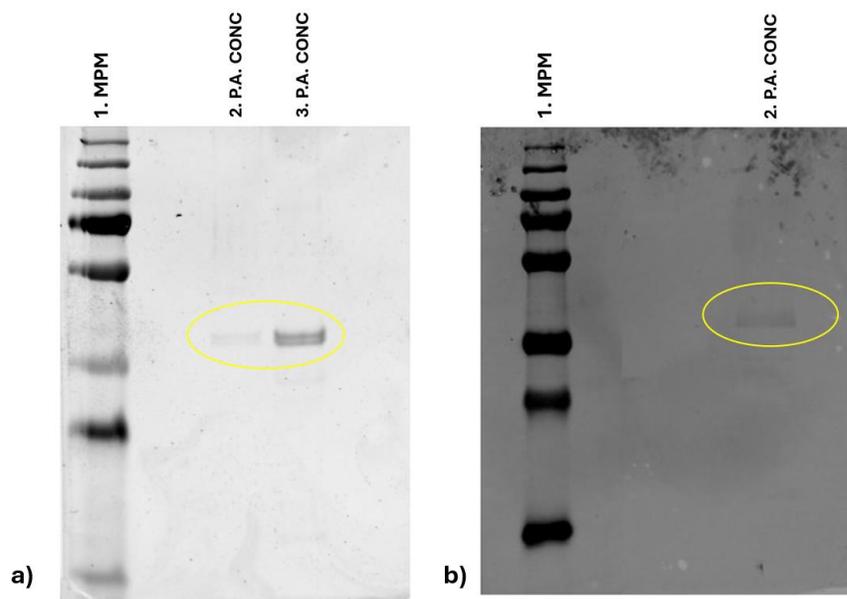


Figura 5. Identificación de la proteína de P.A. a) Identificación de P.A. de 34 kDa por SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de diferentes fracciones de elución concentradas con membranas *VivaSpin*® a 10 µg/mL y 50 µg/mL (2 y 3), con mayor concentración en el carril 4, marcador de peso molecular (1). b) Western Blot (con anticuerpo primario anti-P.A.) de la fracción concentrada de P.A. por *VivaSpin*® 50 µg/mL.

5.1.3. Cuantificación de P.A. en fracciones solubles e insolubles de extractos de microalgas transformantes

Se realizó la cuantificación de P.A. mediante ELISA indirecto, sensibilizando la placa con 100 ng de proteína de las fracciones de proteínas solubles(s) e insolubles (i) totales de los extractos de microalgas de las líneas nuclear (N), cloroplasto 3 (C3) y microalga no transformada (WT: Wild Type).

El análisis por ELISA indirecto para las fracciones solubles e insolubles indicó que se obtuvo ligeramente más concentración de P.A. en la línea transgénica nuclear comparándola con la línea transplastómica (C3), con una producción de 1.6748 mg por gramo de biomasa seca en la transgénica nuclear, en comparación con la línea transplastómica que tuvo una producción de 1.3046 mg por gramo de

biomasa seca. Al comparar las Figs. 9 y 10 observamos que se obtuvo una mayor cantidad en la fracción soluble (C3s) que en la insoluble (C3i).

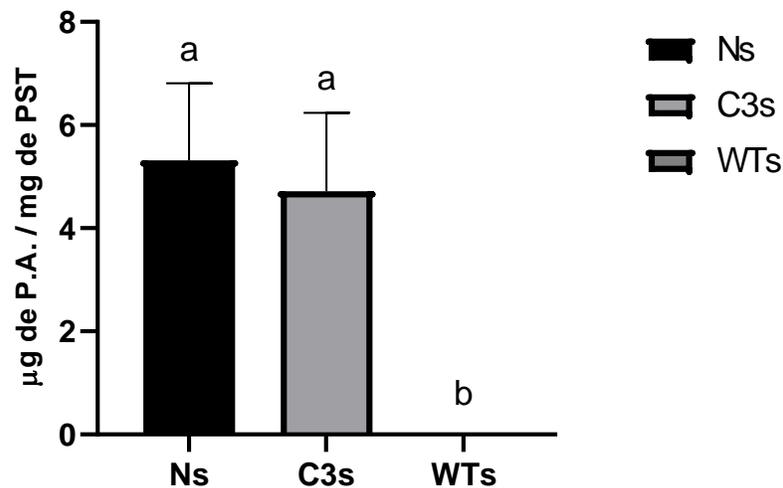


Figura 6. Cantidad de P.A en la fracción de proteína soluble total de las microalgas. ANOVA de una vía ($\alpha < 0.05$). Prueba de comparación de medias de Tukey con confianza del 95%, los grupos que no comparten una letra son significativamente diferentes. PST: Proteína soluble total. Ns: Nuclear soluble. C3s: Cloroplasto 3 soluble. WTi: Wild Type soluble.

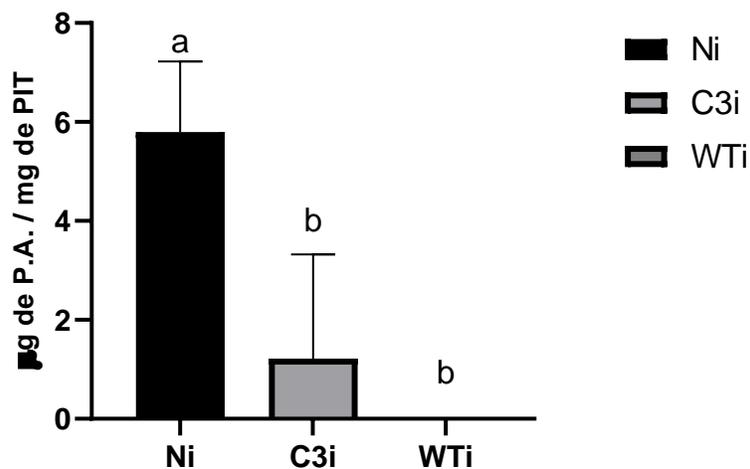


Figura 7. Cantidad de P.A en la fracción de la proteína insoluble total de las microalgas. ANOVA de una vía ($\alpha < 0.05$). Prueba de comparación de medias de Tukey con confianza del 95%, los grupos que no comparten una letra son significativamente diferentes. PIT: Proteína insoluble total. Ni: Nuclear insoluble. C3i: Cloroplasto 3 insoluble. WTi: Wild Type insoluble.

5.1.4. Cuantificación de anticuerpos en suero, lavados gastrointestinales y lavados traqueopulmonares de ratonas BALB/c

La proteína antigénica expresada en *C. reinhardtii* se utilizó para inmunizar por vía oral en ratonas hembra BALB/c. El grupo de ratonas inmunizadas con la biomasa que contiene P.A. mostró producción de la inmunoglobulina de tipo IgG. Este tipo de inmunoglobulina se detectó en sueros del grupo 1 (microalga de P.A. nuclear) y grupo 2 (microalga de P.A. cloroplasto), después de la primera semana de la inmunización con una diferencia significativa respecto a los grupos de control negativos que son el grupo 3 (microalga no transformante; WT, wild type) y grupo 5 (PBS). Por otro lado, existe una diferencia significativa con los grupos: grupo 6 (vacuna comercial vía oral) y grupo 7 (vacuna comercial vía intramuscular) en los cuales se mostró muy poca producción de IgG. Después de la segunda inmunización, los grupos 6 y 7 fallecieron por una posible hiper-reacción a la vacuna comercial. En la segunda inmunización se puede observar que hubo una disminución de los niveles de IgG en todos los grupos. En la tercera inmunización sí se notó una diferencia entre los tratamientos y los controles, pero los valores fueron inferiores a la primera inmunización. En las muestras tomadas al momento de la eutanasia no hubo diferencia entre los tratamientos, pero los valores resultaron inferiores a la primera inmunización (Fig. 11).

IgG in serum

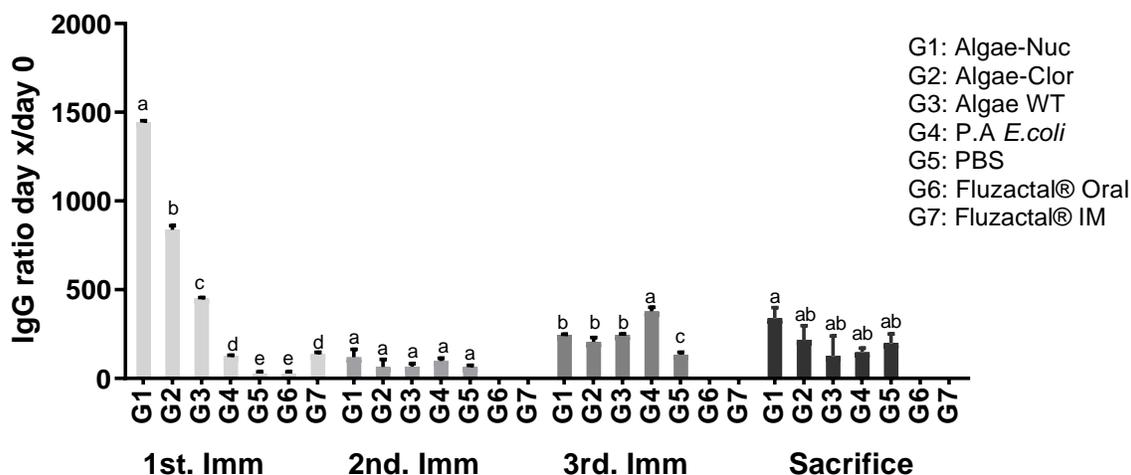


Figura 8. Determinación del título de anticuerpos de tipo IgG de los grupos experimentales contra P.A. Titulación de anticuerpos IgG en suero durante las tres inmunizaciones y de la eutanasia. La comparación de la relación de la cantidad de IgG del día de la toma de muestra entre el día cero, de los sueros de los grupos experimentales, se realizó por ANOVA de dos vías ($\alpha=0.05$). Prueba de comparación de medias de Tukey's (95% de confianza).

No se detectaron anticuerpos IgA durante las tres inmunizaciones realizadas, este tipo de anticuerpos es de importancia en mucosas, y al no detectarse podría indicar que se requiere usar o más cantidad de antígeno o una combinación de rutas de inmunización como lo han reportado algunos autores (Mazur et al., 2023). Por otro lado, los anticuerpos de tipo IgM son los que se producen en los primeros días ante el contacto con un antígeno, y usualmente en días posteriores decrecen. En nuestro experimento se observó que hay muy poca producción de IgM desde la primera inmunización hasta la tercera (Fig. 12). Los grupos P.A expresada en el cloroplasto, así como el grupo inmunizado con la vacuna comercial fueron los que mostraron diferencias significativas, respecto a los demás tratamientos, pero eso solo ocurrió posterior al primer evento de inmunización.

Adicionalmente es importante analizar la producción de IgEs cuando se desea analizar nuevos prototipos vacunales, debido que en algunos casos existen epítomos que pueden desencadenar una reacción anafiláctica (Reyes-Barrera, 2021). En este ensayo podemos ver que hay una producción basal de IgE, pero ésta no es significativamente diferente respecto al control de PBS (Fig. 13).

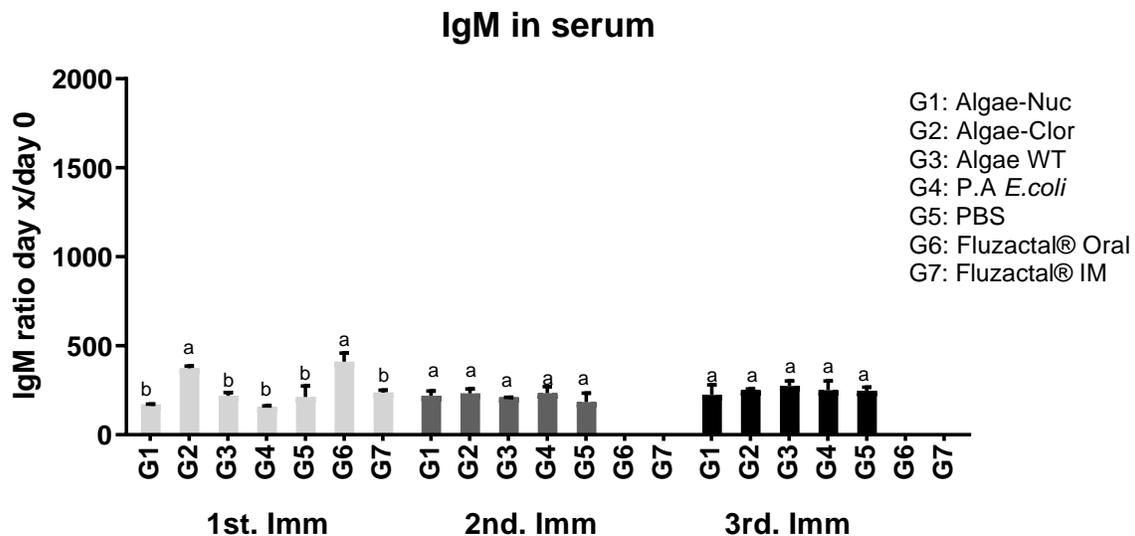


Figura 12. Determinación del título de anticuerpos de tipo IgM de los grupos experimentales contra P.A. Titulación de anticuerpos IgM en suero durante las tres inmunizaciones. La comparación de la relación de la cantidad de IgM del día de la toma de muestra entre el día cero, de los sueros de los grupos experimentales, se realizó por ANOVA de dos vías ($\alpha= 0.05$). Prueba de comparación de medias de Tukey's (95% de confianza).

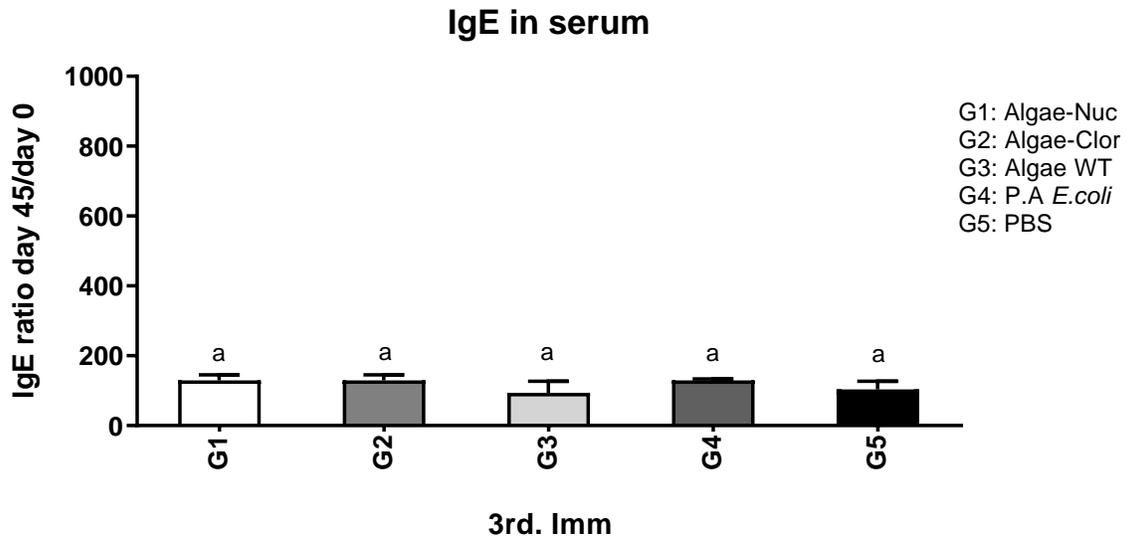


Figura 13. Determinación del título de anticuerpos de tipo IgE de los grupos experimentales contra P.A. Titulación de anticuerpos IgE en suero posterior a la tercera inmunización. La comparación de la relación de la cantidad de IgE del día 45 entre el día cero de los sueros de los grupos experimentales, se realizó por ANOVA de una vía ($\alpha = 0.05$). Prueba de comparación de medias de Tukey's (95% de confianza).

Para las recolecciones de lavados traqueopulmonares se detectó una producción basal de anticuerpo IgG, pero no hubo diferencias significativas con respecto al control de PBS (Fig. 14). Mientras que en lo que respecta a la detección de inmunoglobulinas G en los lavados intestinales, no se lograron detectar, por lo tanto, inferimos que no se produjeron IgG.

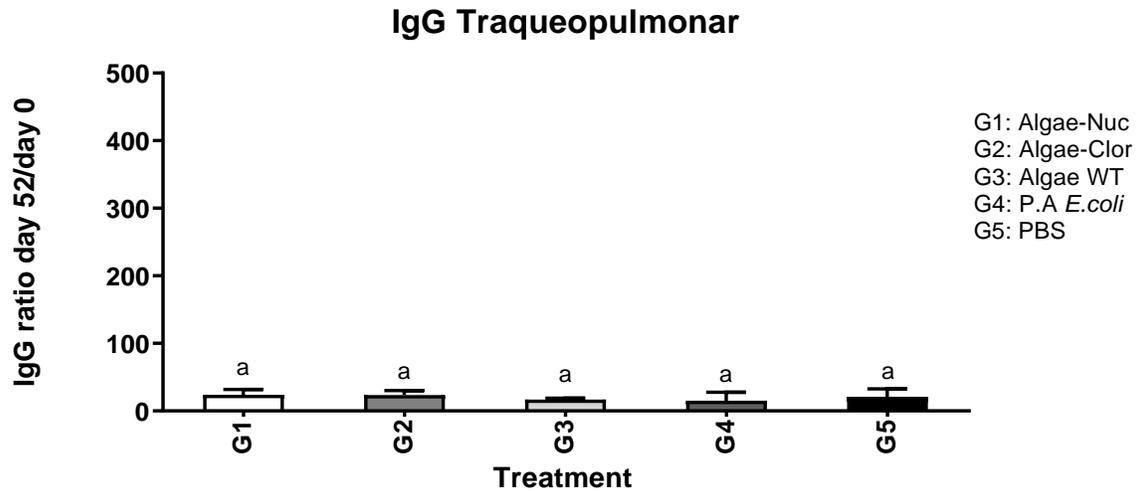


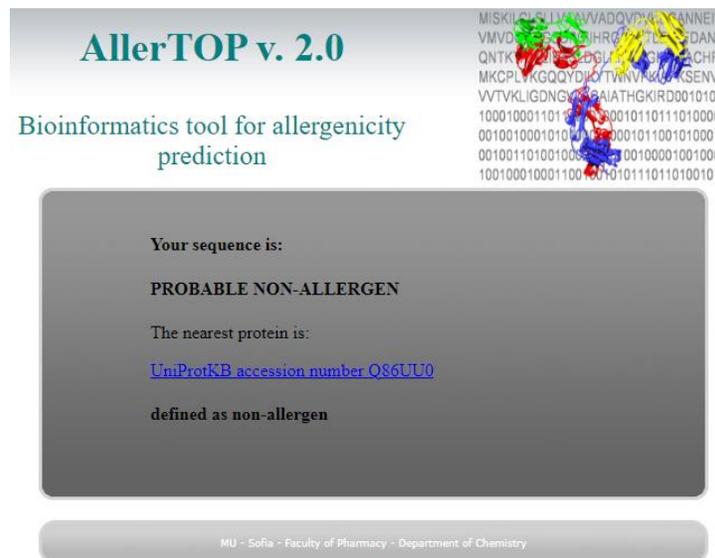
Figura 914. Determinación del título de anticuerpos de tipo IgG de los grupos experimentales en lavados traqueopulmonares contra P.A. Titulación de anticuerpos IgG en lavados con PBS al momento de la eutanasia. La comparación de la relación de la cantidad de IgG del día 52 entre el día cero, de los sueros de los grupos experimentales, se realizó por ANOVA de una vía ($\alpha= 0.05$). Prueba de comparación de medias de Tukey's (95% de confianza).

5.2. Análisis bioinformático de Proteína Antigénica mejorada

Se eligieron 14 epítomos que cumplieron con las características: regiones conservadas, antigénicas, reconocidas por el MHC de clase I y II.

5.2.1. Análisis de alergenicidad de P.A. mejorada por AllerTop v 2.0

La construcción final fue analizada con el servidor web AllerTOP (<https://www.ddg-pharmfac.net/allertop/>) el cual el resultado de la predicción de alergenicidad de la secuencia fue probable no alérgeno (Fig. 15).



The image shows the AllerTOP v. 2.0 web interface. At the top, it says "AllerTOP v. 2.0" and "Bioinformatics tool for allergenicity prediction". On the right, there is a 3D protein structure model and a list of amino acid sequences. The main results area displays: "Your sequence is: PROBABLE NON-ALLERGEN". Below that, it says "The nearest protein is: UniProtKB accession number Q86UU0 defined as non-allergen". At the bottom, there is a footer: "MU - Sofia - Faculty of Pharmacy - Department of Chemistry".

Figura 15. Análisis de alergenicidad para la construcción del gen antigénico. Resultados de predicción de alergenicidad por el programa AllerTOP v. 2.0.

5.2.2. Modelado de construcción de gen antigénico contra influenza

Se realizó un modelado en el servidor I-TASSER para la predicción de la estructura terciaria de las proteínas mediante modelado por homología. Se visualizó con el software ChimeraX versión 1.3 (Fig. 16). El modelo predicho nos indica, que la

mayoría de los epítopos se encuentran expuestos y de manera lineal. De manera adicional, la estructura de la proteína es globular, lo que nos indica que su producción puede ser estable y es posible obtener buenos rendimientos de producción.

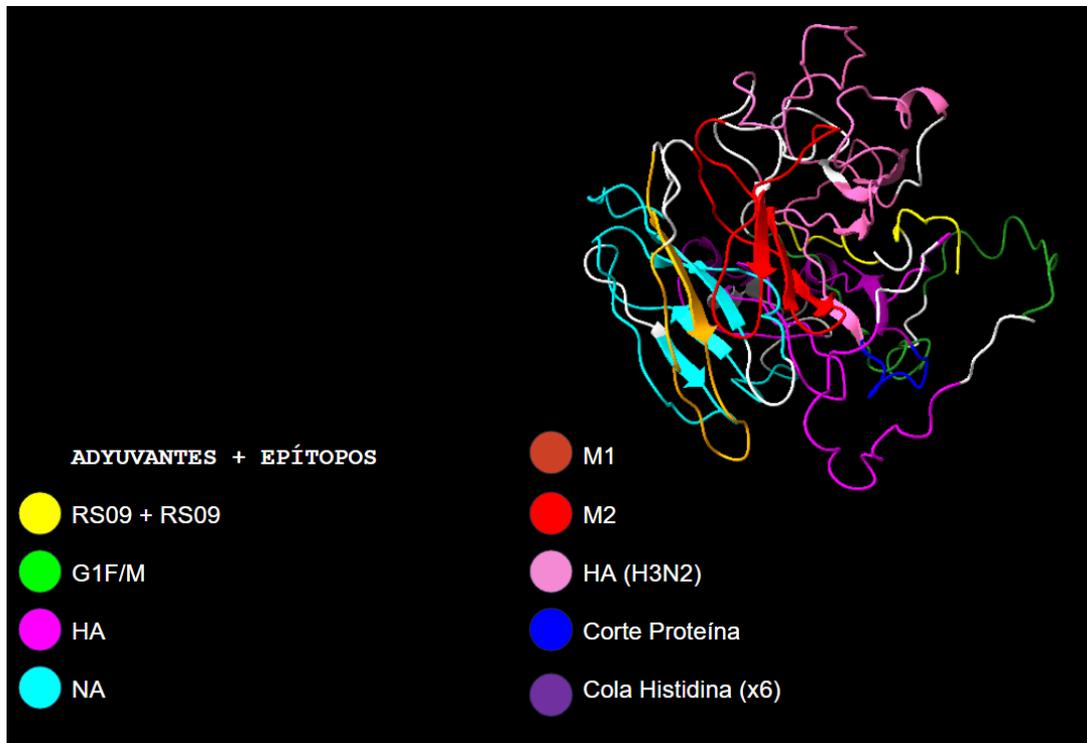


Figura 16. Modelo 3D de la construcción de gen antigénico por I-TASSER.

5.2.3. Vector de expresión pET28b clonado con gen P.A. mejorado

Se seleccionó el vector de expresión pET28a para bacterias y el gen fue clonado por la empresa GenScript en los sitios de las enzimas de digestión *NcoI* y *NotI*, y bajo el promotor T7 (Fig. 17).

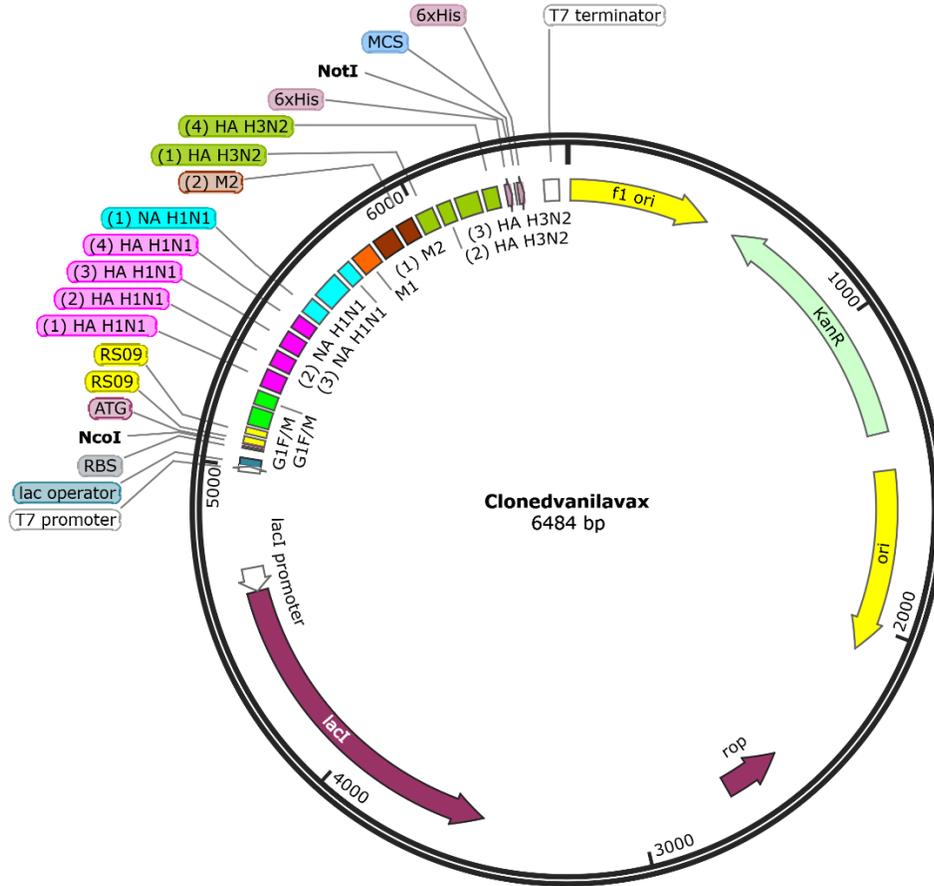


Figura 17. Esquema de la construcción de gen antigénico VanillaVax clonado en vector pET28a bajo el promotor T7.

6. DISCUSIÓN

6.1. Influenza

La enfermedad de la influenza es un problema de salud pública anualmente recurrente, debido a su alta tasa de mutaciones, lo que provoca resistencia a ciertos tipos de fármacos usados para su control (inhibidores de la neuraminidasa o adamantinos). La influenza trae consigo complicaciones respiratorias e incluso sistémicas del organismo, saturación del servicio de salud (área de emergencias de primera línea y terapia intensiva), entre otras. Por lo tanto, la búsqueda de nuevas tecnologías y mejoras para combatir esta enfermedad se requiere cada año (CDC, 2024).

Cabe destacar que las vacunas usadas en 2023 en México no están actualizadas con las variantes presentadas en el mismo año ya que la variante del virus de la influenza tipo A H1N1 es la misma que se usó para la vacuna del año 2021, esto nos confirma que la actualización de las vacunas está desfasada en países que no generan sus propias vacunas y dependen de otros países (Díaz-Ortega et al., 2023).

6.2. Producción de proteína P.A. en microalgas *C. reinhardtii* y

E. coli

Las microalgas han sido consideradas como plataformas de producción de proteínas recombinantes escalables y económicas, por el uso de energías renovables para su crecimiento, resistencia a estrés ambiental y obtención de gran cantidad de biomasa algal (Shaikh-Abdur., 2024). La cantidad de expresión de las

proteínas recombinantes en microalga depende del promotor utilizado, la optimización de codones para mejor transcripción y ciertas regiones regulatorias (Díaz et al., 2023).

Para mejorar la expresión y transformación de la proteína P.A. en el núcleo de la microalga se le añadió una secuencia de señal Pr1a para dirigir la proteína sintetizada hacia el retículo endoplasmático y una secuencia péptido señal KDEL que mantiene a la proteína anclada a la membrana interna del retículo endoplásmico, además que impide el efecto negativo de las proteasas (Cela et al., 2022). Nuestro grupo de trabajo también ha logrado expresar proteínas en el cloroplasto de la microalga, por ejemplo, el péptido EB (Entry Blocker) diseñado por la Dra. Karen Reyes, se produjo en una línea transplastómica (18 µg por gramo de biomasa fresca) (Reyes-Barrera, 2021).

En la presente investigación, se realizó producción de P.A. tanto en núcleo como cloroplasto de la microalga, esto para comparar el sistema de expresión y recolección de purificación de la proteína deseada. Aunque se han reportado niveles mayores de proteínas producidas en cloroplasto respecto al núcleo, no siempre sucede esto. Según los resultados obtenidos, se puede considerar que hubo un poco más de obtención de P.A. en el sistema de nuclear que, en cloroplasto, con una diferencia del 5%. Lo que podría indicar un efecto del transformosoma que se refiere a la transformación de cada línea generada transgénica puede obtener características particulares que afectan también la eficiencia de la expresión de las proteínas recombinantes (Surzycki et al., 2009).

Para el caso de la producción de P.A. en *E. coli*, al inducirse P.A. con IPTG, se acumula mayormente en la fracción insoluble ya que se forman cuerpos de inclusión

en el citoplasma de *E. coli* (Zhao et al., 2020). Su aislamiento en condiciones desnaturalizantes permite disminuir la contaminación proteica en el proceso de purificación por columna de níquel, que da una recuperación del 95% de P.A. en la fracción insoluble (Reyes-Barrera, 2021).

6.3. Análisis inmunogénico de grupos de ratonas BALB/c administradas con P.A. expresada en microalgas

La microalga *C. reinhardtii* ha demostrado ser excelente plataforma de expresión, y además es reconocido como generalmente seguro (GRAS, por sus siglas en inglés) por la *Food and Drug Administration* (FDA, por sus siglas en inglés). Algunos estudios han demostrado que genera beneficios positivos a la salud del individuo y que no es tóxico para su consumo (Ochoa-Méndez et al., 2016).

En la presente investigación, se consideró la administración oral de 10 µg de P.A. en ratonas BALB/c, de proteína expresada en núcleo y cloroplasto, además de microalga no transformada. Moldoveanu et al., (1993) demostraron que proteínas totales de influenza A H3N2 en microesferas poliméricas con esta cantidad de 50 µg de proteínas inducía respuestas inmunes protectoras mejor que una vacuna convencional, por lo que el uso de microalgas como acarreador, pudiera dar una mejor respuesta inmunitaria.

La inmunización vía oral en ratonas BALB/c con proteína antigénica, expresada en núcleo y cloroplasto de microalgas, tuvo la capacidad de producir anticuerpos de tipo IgG después de la primera inmunización, pero en la segunda inmunización disminuyó considerablemente la cantidad de anticuerpos circulantes en el suero, después de la tercera inmunización hay poca elevación de los niveles de IgG. Esto

nos permite reconocer que P.A. puede activar la respuesta humoral desde el principio de la inmunización, pero que puede ocurrir una posible tolerancia a la vacuna y por ello reducir la producción de IgGs (Saghari et al., 2022). Al ser una inmunización vía oral, los antígenos desencadenan una respuesta inmune sistémica de hipersensibilidad retardada, que dependiendo de la dosis y de la frecuencia de inmunización, puede llevar a la tolerancia del antígeno mediante cambio de isotipo según necesidad (Pabst & Mowat, 2012).

Para IgM en la primera inmunización sí se detectó esta inmunoglobulina, pero disminuyó a partir de la segunda inmunización. Esto puede indicar que hubo un primer mecanismo de defensa humoral, pero que también hubo supresión de la respuesta humoral en IgM y nula producción de IgA, debido a una posible tolerancia inmunitaria lo que reduce la proliferación de linfocitos T y citoquinas que promueven la producción de inmunoglobulinas de la vía de las mucosas (Pabst & Mowat, 2012). También puede indicar que no necesariamente existe una defensa inmunoprotectora en la primera línea de defensa, pero sí en la adaptativa en su primera interacción, como se muestra con IgG. Una investigación reciente demostró que la vacunación comestible con Lechuga *Lactuca sativa* que contiene heterodímero E1E2 del virus de la hepatitis C, desencadena la producción de anticuerpos de tipo IgA secretora, lo que nos confirma su utilidad, pero presentó cantidades de IgM deficientes (Clarke et al., 2017).

Una de las características importantes para la generación de una vacuna es que no genere reacciones alérgicas lo que puede ser contraproducente al administrarse en el individuo. Previamente se realizó un análisis bioinformático en

el servidor de AllerTop que determinó P.A. como no alergeno, esto se confirmó con la producción basal de anticuerpos IgE durante las tres inmunizaciones orales.

Las vacunas comestibles a nivel experimental han demostrado ser una excelente vía de administración, además de no depender de la ruta de frío para su traslado (si están liofilizadas) y facilita las jornadas de salud ya que no requiere de personal especializado para su aplicación y al ser menos invasiva, es recomendable para aplicar a los menores de edad (Vela et al., 2017). Cabe destacar, que la vía de administración promueve la vía humoral y celular de forma sistémica, pero es necesario realizar estudios para ver cual es la mejor dosis que pueda generar una respuesta inmunitaria adecuada, ya que una parte se degrada en el intestino, además la combinación de rutas de inmunización pueden generar mejores respuestas (Xu et al., 2023) (Ibraheem et al., 2014). Esta investigación nos muestra que es posible utilizar *C. reinhardtii* como plataforma de expresión de proteínas recombinantes, además de su uso como vector de administración comestible para producir anticuerpos, pero es necesario seguir realizando estudios y profundizar más para reconocer puntos de mejora para obtener una mejor respuesta inmunitaria.

6.4. Análisis bioinformático de gen de P.A. mejorado para H1N1 y H3N2

La actualización de nuevos prototipos y tecnologías de vacunas es una necesidad obligatoria de cada año, por la variedad antigénica que existe en el caso del virus de la influenza. En nuestro grupo de investigación se han realizado pruebas de concepto con proteínas recombinantes contra enfermedades respiratorias, las

cuales se han producido en plantas, microalgas y bacterias como plataformas de producción, con resultados satisfactorios ante respuesta inmunitaria de proteínas antigénicas. Partiendo del diseño de una proteína contra influenza, decidimos mejorar la construcción y tomamos secuencias de las cepas circulantes. Por otro lado, notamos que existen regiones que aún se presentan conservadas en los subtipos del virus de la influenza A, por ejemplo, la proteína M2 presenta un ectodominio aminoterminal de 23 aminoácidos, que cumple un papel importante durante la replicación y el ensamblaje viral, por ello, se ha tomado en cuenta a la fabricación de muchas vacunas contra la influenza (Xiong et al., 2023). También notamos que el tallo de la estructura de la hemaglutinina (HA), cuenta con secuencias aminoacídicas conservadas, además de generar una mejor producción de inmunoglobulinas contra esta región (Krammer et al., 2018).

Nuestro nuevo diseño fue probado *in silico* y demostró no presentar regiones alergénicas lo cual es recomendable para el desarrollo de nuevas vacunas. Además, hay que considerar el tener un balance entre Th1 y Th2, ya que, Th1 promueve la respuesta inmunitaria mediada por células que generan citocinas proinflamatorias como IL-12, IL-2, IFN- γ y TNF- β que puede bloquear la entrada del virus; en el caso de Th2 hay respuesta mediada por anticuerpos y promoción de citocinas antiinflamatorias como IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (Alebrahim-Dehkordi, 2022). Durante el diseño de la construcción del gen antigénico se tomó en cuenta un fragmento y un epítipo de la proteína G y M2 del virus sincitial respiratorio, donde la proteína G genera una respuesta Th2 y M2 genera una respuesta proinflamatoria de tipo Th1, que induce a un balance IgG1/IgG2a. Debido a reportes anteriores, la proteína de fusión G1F/M2 fue parte fundamental del diseño

del gen antigénico tanto para P.A. y proteína antigénica mejorada (Li et al., 2019). Actualmente, la bioinformática ha sido una de las innovaciones tecnológicas fundamentales para el desarrollo de proteínas terapéuticas *in silico*, lo cual nos puede reducir el número de análisis experimentales a probar. Las bases de datos de secuencias disponibles son una fuente que nos ayuda en el diseño pues podemos alinearlas y saber qué regiones son las conservadas y luego con softwares especializados ver si teóricamente serían antigénicas y se presentarían ante MHC I y II, y además evitar regiones no deseadas (alergénicas). En este caso, nuestra proteína P.A. mejorada, abarca epítomos del virus de la influenza A H1N1 y H3N2, que durante los años 2019 hasta 2022 estaban circulando. Las características consideradas para su construcción fueron epítomos conservados en su mayoría, antigénicos, reconocidos por MHC I y II, y en algunos casos, con relevancia estructural. Se eligieron epítomos de las proteínas HA, NA, M1 y M2 de H1N1, y HA de H3N2. La hemaglutinina (HA) se encuentra en la superficie del virus y es la responsable de la unión del virus a la célula infectada, se fija a residuos de ácido siálico en la membrana plasmática. Por ello, se tomó en cuenta, la región del tallo proximal de HA (subunidad S1) por ser conservado entre varios otros subtipos, además de promover el reconocimiento para inducir respuesta adaptativa (Reyes-Barrera, 2021). Widge et al., (2023) evaluaron la capacidad inmunitaria de H1ssF, una vacuna de nanopartículas dirigidas al tallo de HA con regiones conservadas, que generó una respuesta humoral y duradera en adultos de entre 18 y 70 años. Además, se ha comprobado que estos epítomos son necesarios para la realización de una vacuna universal pues al utilizar sueros con anticuerpos neutralizantes se demostró la capacidad de inhibir la unión en tres regiones importantes del dominio

de HA que son el subdominio VE, la parte circundante del RBS y la región oculta ocluida del monómero de HA1 (Jiao et al., 2023).

Parte de las regiones antigénicas escogidas fue del ectodominio de la proteína M2 por su conservación de aminoácidos y que la mayoría de las vacunas que la contienen brindan protección de tipo IgG en H1N1 y H3N2 (Saelens, 2019). La proteína M2 forma parte del ensamblaje y gemación viral, además de la activación de inflamomas y la interferencia en la autofagia (Carter & Iqbar, 2024). También se ha demostrado que estas regiones de M2 brindan protección en los virus de influenza tipo A y que son de amplio espectro; por ejemplo, para H5N2 se hizo una vacuna de secuencia M2 fusionado con el ADN de HA de la cepa H1N1, lo que resultó en ser altamente inmunogénico y de respuestas CTL (Linfocitos T Citotóxicos) específicas (Park et al., 2011).

Anteriormente, la Dra. Karen Reyes en nuestro grupo de trabajo realizó un análisis bioinformático de los espaciadores de glicinas y prolinas (GPGPG) de la construcción de P.A. que evidenció su capacidad de exponer de manera lineal los epítomos para un mejor reconocimiento por MHC I y II, mediante predicción de estructura 3D (Reyes-Barrera, 2016).

7. CONCLUSIONES

- Es posible expresar y purificar la proteína antigénica P.A. de *E. coli* BL21 y *Rosetta*, transformadas con el vector de expresión pET28b-P.A. y generar la curva estándar para su cuantificación por ELISA.
- *Chlamydomonas reinhardtii* puede expresar la proteína P.A. tanto en núcleo como cloroplasto, principalmente en la fracción soluble.
- La inmunización vía oral de microalga en ratonas BALB/c con la proteína antigénica (P.A.) expresada en núcleo y cloroplasto, genera una respuesta inmunitaria de tipo adaptativo humoral, produciendo anticuerpos de tipo IgG e IgM anti P.A. en el suero de la sangre venosa, solo en los primeros 15 días post primera inmunización.
- La vía de administración oral no genera anticuerpos de tipo IgA e IgE anti P.A. en suero de la sangre venosa, intestinos y pulmones.
- El gen de la proteína antigénica putativamente mejorada contiene epítomos relevantes de influenza A H1N1 y H3N2, y no es alergénico conforme a los resultados obtenidos de los servidores de predicción de epítomos, reconocimiento a MHC I y II y predictor de alergenicidad. Además, contiene adyuvantes proteínicos para mejorar el balance Th1/Th2.

8. PERSPECTIVAS

1. Realizar ensayos adicionales con diferentes cantidades de la proteína P.A. y combinación de rutas de inmunización para obtener mejores resultados en la producción de inmunoglobulinas, en particular de IgA.
2. Expresar y purificar la proteína antigénica mejorada en *E. coli*.
3. Probar la inmunogenicidad de la proteína antigénica mejorada mediante ensayos de inmunización vía intramuscular y oral en ratones BALB/c.

REFERENCIAS

- Ahmed, I., Damilola, A., Toyosi, G., Ayse, S., Musefiu, A., Eylem, A. (2023). Algae as a potential source of protein: A review on cultivation, harvesting, extraction, and applications. *Algal Research*, 77, 11-64. doi: 10.1016/j.algal.2023.103329
- Aleebrahim-Dehkordi, E., Molavi, B., Mokhtari, M., Deravi, N., Fathi, M., Fazel, T., Mohebalizadeh, M., Koochaki, P., Shobeiri, P., & Hasanpour-Dehkordi, A. (2022). T helper type (Th1/Th2) responses to SARS-CoV-2 and influenza A(H1N1) virus: From cytokines produced to immune responses. *Transplant immunology*, 70, 101495. doi: doi.org/10.1016/j.trim.2021.101495
- Angulo, K., Campos, J., Monge, S., Mora, J., Vargas, R., González, D., et al. (2023). Use of microorganisms for biological and biotechnological drugs development. *International Journal of Modern Pharmaceutical Research*, 7(4), 1-4. ISSN: 2319-5878.
- Arias, C. A. D., Matsudo, M. C., Ferreira-Camargo, L. S., Molino, J. V. D., Mayfield, S. P., & de Carvalho, J. C. M. (2021). Semicontinuous system for the production of recombinant mCherry protein in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology Progress*, 37(2), e3101. doi: 10.1002/btpr.3101
- Bahadoran, A., Lee, S. H., Wang, S. M., Manikam, R., Rajarajeswaran, J., Raju, C. S., & Sekaran, S. D. (2016). Immune responses to influenza virus and its correlation to age and inherited factors. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1841. doi: 10.3389/fmicb.2016.01841
- Blázquez, A., Huicochea, N. & Reyes, L. (2023). Considerations in plant-based edible vaccines for humans. *RD-ICUAP*, 9(27), 33-43. doi: 10.32399/icuap.rdic.2448-5829.2023.27.1174
- Carter, T., & Iqbal, M. (2024). The influenza A virus replication cycle: A comprehensive review. *Viruses*, 16(2), 316. doi: doi.org/10.3390/v16020316
- Casas, I., Colmenares, K., Blanco, B. & Valera, J. (2024). The value of vaccines in the 21st century. *Medicina Clínica*, 162(9), 448-454. ISSN 0025-7753. doi: doi.org/10.1016/j.medcli.2023.10.025.
- Cela, I., Dufrusine, B., Rossi, C., Luini, A., De Laurenzi, V., Federici, L., & Sallese, M. (2022). KDEL receptors: Pathophysiological functions, therapeutic options, and

- biotechnological opportunities. *Biomedicines*, 10(6). doi: doi.org/10.3390/biomedicines10061234
- CDC. (2022). *Influenza (gripe)*. Recuperado el 20 de octubre del 2023, de CDC: <https://espanol.cdc.gov/flu/about/season/index.html>
- CDC. (2024). Selección de los virus para la vacuna contra la influenza estacional. Recuperado el 19 de agosto del 2024, de CDC: <https://espanol.cdc.gov/flu/prevent/vaccine-selection.htm>
- Clarke, J. L., Paruch, L., Dobrica, M. O., Caras, I., Tucureanu, C., & Onu, A. (2017). Lettuce-produced hepatitis C virus E1E2 heterodimer triggers immune responses in mice and antibody production after oral vaccination. *Plant Biotechnology Journal*, 15(12), 1611–1621. doi: 10.1111/pbi.12743
- Dawood, F. S. (2009). Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *The New England Journal of Medicine*, 360(25), 5-15. doi: 10.1056/NEJMoa0903810
- Dawood, F. S., Iuliano, A. D., Reed, C., Meltzer, M. I., Shay, D. I., Cheng, P. Y., et al. (2012). Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. *The Lancet Infectious Diseases*, 12(9), 687-695. doi: 10.1016/S1473-3099(12)70121-4
- Demurtas, O. C., Massa, S., Ferrante, P., Venuti, A., Franconi, R., Giuliano, G. (2013). A Chlamydomonas-Derived Human Papillomavirus 16 E7 Vaccine Induces Specific Tumor Protection. *Plos One*, 8(4). doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061473>
- Díaz, C., Martiniuc, C., Dutra, J., Ferreira, L., Chuei, M & Monteiro, J. (2023). Production of recombinant biopharmaceuticals in *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Plant Biology*, 14(1), 39-52. doi: doi.org/10.3390/ijpb14010004
- Díaz-Ortega, J. L., Gaertner-Barnad, S., García-Velasco, L., Alvarado-Soriano, I., Hernandez-Carrillo, J. M., Padrón-Lucio, S. (2023). Lineamientos de Vacunación para la Temporada de Influenza Estacional 2022-2023. *Recuperado el 20 de octubre del 2023, Secretaría de la Salud: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/760241/Influenza_2022-2023.PDF*

- DGE. (2022). Informe Semanal de Enfermedad Respiratoria Viral. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud. Recuperado el 20 de octubre del 2023: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/826408/INFLUENZA_OVR_SE20_2023.pdf
- FDA. (2023). Food and Drug Administration, FDA. Recuperado el 10 de octubre del 2023: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/lot-release/influenza-vaccine-2023-2024-season>
- Gaitonde, D. Y., Moore, F. C., & Morgan, M. K. (2019). Influenza: Diagnosis and treatment. *American Family Physician*, 100(12), 751–758.
- Gu, X., Zhou, F., Wang, Y., Fan, G., & Cao, B. (2020). Respiratory viral sepsis: epidemiology, pathophysiology, diagnosis and treatment. *European Respiratory Review: An Official Journal of the European Respiratory Society*, 29(157), 200038. doi: 10.1183/16000617.0038-2020
- Hempel, F. & Maier, U. (2012). An engineered diatom acting like a plasma cell secreting human IgG antibodies with high efficiency. *Microbial Cell Factories*, 11(126). doi: 10.1186/1475-2859-11-126
- Hyunsuh, K., Robert, W. & Webby, R. (2018). Influenza Virus: Dealing with a Drifting and Shifting Pathogen. *Viral Immunology*, 31(2),174-183. doi: 10.1089/vim.2017.0141
- Ibraheem, D., Elaissari, A. & Fessi, H. (2014). Administration strategies for proteins and peptides. *International Journal of Pharmaceutics*, 477(1-2), 578-589. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.10.059
- ICTV. (2021). Taxon Details: Alphainfluenzavirus influenzae. *International Committee on Taxonomy of Viruses*. Recuperado el 20 de octubre del 2023: https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202303956&taxon_name=Alphainfluenzavirus%20influenzae
- Javanian, M., Barary, M. & Ghebrehewet, S. (2021). A brief review of influenza virus infection. *Journal of Medical Virology*, 93(8), 4638-4646. doi: 10.1002/jmv.26990
- Jiao, C., Wang, B., Chen, P., Jiang, Y., & Liu, J. (2023). Analysis of the conserved protective epitopes of hemagglutinin on influenza A viruses. *Frontiers in Immunology*, 14. doi: 10.3389/fimmu.2023.1086297

- Jilani, N. T., Jamil, R. T., & Siddiqui, A. H. (2024). H1N1 Influenza. *StatPearls Publishing*. Recuperado el 20 de octubre del 2024: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513241>
- Kastenschmidt, J. M., Sureshchandra, S., Jain, A., Hernandez, J. E., Assis, R., Wagoner, Z., et al. (2023). Influenza vaccine format mediates distinct cellular and antibody responses in human immune organoids.. *Immunity*, 56(8),1910-1926. doi:10.1016/j.immuni.2023.06.019
- Kaur, J., Kumar, A. & Kaur, J. (2018). Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 803-822. ISSN 0141-8130. doi: doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080.
- Keilman L. J. (2019). Seasonal influenza (Flu). *The Nursing Clinics of North America*, 54(2), 227–243. doi: 10.1016/j.cnur.2019.02.009
- Kim, P., Jang, Y. H., Kwon, S. B., Lee, C., Han, G., & Seong, B. (2018). Glycosylation of hemagglutinin and neuraminidase of influenza A virus as signature for ecological spillover and adaptation among influenza reservoirs. *Viruses* 10(183). doi: 10.3390/v10040183
- Krammer, F., Smith, G., Fouchier, R., Peiris, M., et al. (2018). Influenza. *Nature Reviews Disease Primers* , 4(3). doi: 10.1038/s41572-018-0002-y
- Kreuder, C., Hitchens, P., Smiley, T., Goldstein, T., Thomas, K., Clements, A., Joly, D. O., Wolfe, N., Daszak, P., Karesh, W., & Mazet, J. (2015). Spillover and pandemic properties of zoonotic viruses with high host plasticity. *Scientific Reports*, 5, 14830. doi: doi.org/10.1038/srep14830
- Kwon, H., Ko, S., Ha, K., Lee, J. K., & Choi, Y. (2024). Assessing the predictive ability of computational epitope prediction methods on Fel d 1 and other allergens. *PLoS One*, 19(8). doi: doi.org/10.1371/journal.pone.0306254
- Lazova, S., Dimitrova, Y., Hristova, D., Tzotcheva, I., & Velikova, T. (2022). Cellular, antibody and cytokine pathways in children with acute SARS-CoV-2 infection and MIS-C-can we match the puzzle?. *Antibodies (Basel, Switzerland)*, 11(2), 25. <https://doi.org/10.3390/antib11020025>
- Leiva-Rebollo, R., Gémez-Mata, J., Castro, D., Borrego, J. J., & Labella, A. M. (2023). Immune response of DNA vaccinated-gilthead seabream (*Sparus aurata*) against

- LCDV-Sa infection: relevance of the inflammatory process. *Frontiers in immunology*, 14, 1209926. doi: doi.org/10.3389/fimmu.2023.1209926
- Li, N., Zhang, L., Zheng, B., Li, W., Liu, J., Zhang, H., & Zeng, R. (2019). RSV recombinant candidate vaccine G1F/M2 with CpG as an adjuvant prevents vaccine-associated lung inflammation, which may be associated with the appropriate types of immune memory in spleens and lungs. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 15(11), 2684–2694. doi: doi.org/10.1080/21645515.2019.1596710
- Lin, Y., Xiong, X., Wharton, S., & McCauley, J. (2012). Evolution of the receptor binding properties of the influenza A(H3N2) hemagglutinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(52), 1474-1479. doi: 10.1073/pnas.121884111
- Luczo, J. M., Ronzulli, S. L., & Tompkins, S. M. (2021). Influenza A virus hemagglutinin and other pathogen glycoprotein interactions with NK cell natural cytotoxicity receptors NKp46, NKp44, and NKp30. *Viruses*, 13(2), 156. doi: doi.org/10.3390/v13020156
- Márquez, V., Bañuelos, B. & Rosales, S. (2018). Expression of a Zika virus antigen in microalgae: Towards mucosal vaccine development. *Journal of Biotechnology*, 282, 86-91. doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.07.025
- Mazur, N. I., Terstappen, J., Baral, R., Bardají, A., Beutels, P., Buchholz, U. J., et al. (2023). Respiratory syncytial virus prevention within reach: the vaccine and monoclonal antibody landscape. *The Lancet. Infectious Diseases*, 23(1), e2–e21. doi: 10.1016/S1473-3099(22)00291-2
- Menéndez, E., Navarro, J. & Ochoa, F., (2020). Genetic improvement in tobacco crops. Molecular mechanisms and regulation. *Revista de Investigaciones ULCB*, 6(2), 41-54. doi: 10.36955/RIULCB.2019v6n2.004
- Mohammad, S., Farahani, N. & Golichenari, B. (2018). Recombinant protein expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): What we need to know. *Current Pharmaceutical Design*, 24(6), 718-725. doi: 10.2174/1381612824666180131121940
- Moldoveanu, Z., Novak, M., Huang, W., Gilley, R., Staas, J., Schafer, D., et al. (1993). Oral immunization with influenza virus in biodegradable microspheres. *The Journal of Infectious Diseases*, 167(1), 84–90. doi: 10.1093/infdis/167.1.84

- Nievergelt, A. P., Diener, D. R., Bogdanova, A., Brown, T., & Pigino, G. (2023). Efficient precision editing of endogenous *Chlamydomonas reinhardtii* genes with CRISPR-Cas. *Cell Reports Methods*, 3(8), 443-451. doi: 10.1016/j.crmeth.2023.100562
- Nowalk, M., Smith, K., Raviotta, J., Wateska, A & Zimmerman, R. (2024). Cost-effectiveness of recombinant influenza vaccine compared with standard dose influenza vaccine in adults 18–64 years of age. *Vaccine*. ISSN: 0264-410X. doi: doi.org/10.1016/j.vaccine.2024.07.008.
- Nuismer, S., Basinski, A., Schreiner, C., Whitlock, A., & Remien, C. (2022). Reservoir population ecology, viral evolution and the risk of emerging infectious disease. *Proceeding of the Royal Society B*, 289(1982). doi: 10.1098/rspb.2022.1080
- Ochoa-Méndez, C. E., Lara-Hernández, I., González, L. M., Aguirre-Bañuelos, P., Ibarra-Barajas, M., Castro-Moreno, P., González-Ortega, O., & Soria-Guerra, R. E. (2016). Bioactivity of an antihypertensive peptide expressed in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biotechnology*, 240, 76-84. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.11.001
- OMS. (2023). *Organización Mundial de la Salud*. Recuperado el 10 del octubre del 2023: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))
- OPS. (2023). *Informe de situación de Influenza, SARS-CoV-2, VSR y otros virus respiratorios*. Rcuperado el 10 de octubre del 2023: <https://www.paho.org/es/informe-situacion-influenza>
- Pabst, O., & Mowat, A. M. (2012). Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunology*, 5(3), 232–239. Doi: 10.1038/mi.2012.4
- Padmanabhan, R., Narayan, S. & Miller, D. (2020). Promoter length affects the initiation of T7 RNA polymerase in vitro: New insights into promoter/polymerase co-evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 88(2), 179-193. doi: 10.1007/s00239-019-09922-3
- Park, K. S., Seo, Y. B., Lee, J. Y., Im, S. J., Seo, S. H., Song, M. S., Choi, Y. K., & Sung, Y. C. (2011). Complete protection against a H5N2 avian influenza virus by a DNA vaccine expressing a fusion protein of H1N1 HA and M2e. *Vaccine*, 29(33), 5481–5487. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.062
- Pérez, J. & Fernández, M. (2023). Influenza diagnosis, treatment and prophylaxis. Consensus statement. *Vacunas (English Edition)*, 24(2) 81-83. ISSN 2445-1460. doi: doi.org/10.1016/j.vacune.2023.04.007.

- Petrie, J. G., Parkhouse, K., Ohmit, S. E., Malosh, R. E., Monto, A. S., & Hensley, S. E. (2016). Antibodies against the current influenza A(H1N1) vaccine strain do not protect some individuals from infection with contemporary circulating influenza A(H1N1) virus strains.. *The Journal of Infectious Diseases*, 12(214), 947-957. doi: 10.1093/infdis/jiw479
- PROTALIX. (2012). Elelyso® for Gaucher Disease. *Protalix Biotherapeutics*. Recuperado el 20 de octubre del 2023: <https://protalix.com/about/elelyso/>
- Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N. P., Bachor, O. A., & Stevanović, S. (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*, Issue 50(3-4), 213-219. doi: 10.1007/s002510050595
- Rastogi, A., Gautam, S., & Kumar, M. (2024). Bioinformatic elucidation of conserved epitopes to design a potential vaccine candidate against existing and emerging SARS-CoV-2 variants of concern. *Heliyon*, 10(15). doi: doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e35129
- Reyes-Barrera, K.L., (2016). Producción de péptidos contra influenza A H1N1 en *Chlamydomonas reinhardtii*. *Tesis de maestría. IPICYT*, 44-45.
- Reyes-Barrera, K. L., (2021). Caracterización molecular e inmunológica de transformantes de *Chlamydomonas reinhardtii* que contienen un péptido antiviral y una proteína antigénica contra el virus de la influenza A H1N1. *Tesis de doctorado. IPICYT*, 34-35.
- Ryt-Hansen, P., Pedersen, A. G., Larsen, I., Kristensen, C. S., Schak, J., Wacheck, S., et al. (2020). Substantial antigenic drift in the hemagglutinin protein of swine influenza A viruses. *Viruses*, 12(2), 248. doi: 10.3390/v12020248
- Saelens, X. (2019). The role of matrix protein 2 ectodomain in the development of universal influenza vaccines. *The Journal of Infectious Diseases*, 219(1), 68-74. doi: 10.1093/infdis/jiz003
- Saghari, M., Jansen, M., Grievink, H., Rissmann, R. & Moerland, M. (2022). Characterization of KLH-driven immune responses in clinical studies: A systematic review. *Frontiers in Drug Discovery*, 2. doi: 10.3389/fdds.2022.992087
- Sameh, W. & Hafner, J. (2023). Influenza. *STATPEARLS*. doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459363/>

- Sellers, S. A., Hagan, R. S., Hayden, F. G., & Fischer, W. A., 2nd (2017). The hidden burden of influenza: A review of the extra-pulmonary complications of influenza infection. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 11(5), 372–393. doi: 10.1111/irv.12470
- Sengupta, P., & Chattopadhyay, S. (2024). Interferons in viral infections. *Viruses*, 16(3), 451. doi: doi.org/10.3390/v16030451
- Shaikh, R. (2024). Comprehensive overview of microalgae-derived carotenoids and their applications in diverse industries. *Algal Research*, 78. ISSN 2211-9264. doi: doi.org/10.1016/j.algal.2024.103422.
- Surzycki, R., Greenham, K., Kitayama, K., Dibal, F., Wagner, R., Rochaix, J. D., Ajam, T., & Surzycki, S. (2009). Factors affecting expression of vaccines in microalgae. *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization*, 37, 133-138. doi: 10.1016/j.biologicals.2009.02.005
- Tyrrell, C. S., Allen, J. L. Y., & Gkrania-Klotsas, E. (2021). Influenza: epidemiology and hospital management. *Medicine*, 49, 797–804. doi: 10.1016/j.mpmed.2021.09.015
- Vela, J., Sharpe, L. & Peppas, N. (2017). Current state and challenges in developing oral vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 114, 116-131. doi: 10.1016/j.addr.2017.04.008
- Widge, A. T., Hofstetter, A. R., Houser, K. V., Awan, S. F., Chen, G. L., Burgos Florez, M. C., et al. (2023). An influenza hemagglutinin stem nanoparticle vaccine induces cross-group 1 neutralizing antibodies in healthy adults. *Science Translational Medicine*, 15(692). Doi: 10.1126/scitranslmed.ade4790
- Xiong, F., Zhang, C., Shang, B., Zheng, M., Wang, Q., Ding, Y., Luo, J., & Li, X. (2023). An mRNA-based broad-spectrum vaccine candidate confers cross-protection against heterosubtypic influenza A viruses. *Emerging microbes & infections*, 12(2). doi: doi.org/10.1080/22221751.2023.2256422
- Xu, J., Zhang, Y., Qu, P., Shamseldin, M., Yoo, S., Misny, S., et al. (2023). A next-generation intranasal trivalent MMS vaccine induces durable and broad protection against SARS-CoV-2 variants of concern. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(42). doi: 10.1073/pnas.2220403120
- Xu, Y., Zhu, F., Zhou, Z., Ma, S., Zhang, P., Tan, C., Luo, Y., Qin, R., Chen, J., & Pan, P. (2024). A novel mRNA multi-epitope vaccine of *Acinetobacter baumannii* based

on multi-target protein design in immunoinformatic approach. *BMC Genomics*, 25(1), 791. doi: doi.org/10.1186/s12864-024-10691-7

Zainutdinov, S. S., Sivolobova, G. F., Loktev, V. B., & Kochneva, G. V. (2022). Mucosal immunity and vaccines against viral infections. *Problems of Virology*, 66(6), 399–408. doi: doi.org/10.36233/0507-4088-82

Zhang, W., Zhong, H., Lu, H., Zhang, Y., Deng, X., Huang, K., & Duanmu, D. (2018). Characterization of ferredoxin-dependent biliverdin reductase PCYA1 reveals the dual function in retrograde bilin biosynthesis and interaction with light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase LPOR in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Frontiers in Plant Science*, 9, 676. doi: doi.org/10.3389/fpls.2018.00676

Zhao, F., Song, Q., Wang, B., Han, Y. & Zhou, Z. (2020). Purification and immobilization of the soluble and insoluble portions of recombinant lipase by gram-positive enhancer matrix (GEM) particles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 145, 1099-1105. ISSN: 0141-8130. doi: doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.203.

Anexos

A) REACTIVOS

Reactivo	Proveedor
2-mercaptoetanol	Sigma-Aldrich Chemistry, USA
Acetato de sodio	Karal Reactivos Analíticos, MEX
Acetona	Golden Bell Reactivos, MEX
Ácido acético	Golden Bell Reactivos, MEX
Ácido bórico	Sigma Chemical Co. USA
Acrilamida	IBI SCIENTIFIC, USA
Agar grado bacteriológico	Invitrogen, USA
Agarosa	Promega, USA
Albúmina de suero bovino	Sigma Chemical Co. USA
Alcohol etílico	AZ, MEX
Alcohol isopropílico	Golden Bell Reactivos, MEX
Alcohol metílico	Caledon Laboratory Chemicals, CAN
Anticuerpo antihistidinas	GenScript
Anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina	Sigma Chemical Co. USA
Azul Comassie (Blue Brilliant G-250)	Sigma-Aldrich Chemistry, USA
Azul de bromofenol	Sigma-Aldrich Chemistry, USA
Azul de bromofenol	Sigma-Aldrich Chemistry, USA
Bisacrilamida	IBI SCIENTIFIC, USA
Bromuro de etidio	Promega, USA
Cloroformo	Industrial Kem de León S.A. de C.V. México
Cloruro de amonio	Karal Reactivos Analíticos, MEX
Cloruro de calcio	Riedel de Haen. USA
Cloruro de calcio dihidratado	Reasol, USA
Cloruro de magnesio hexahidratado	Karal Reactivos Analíticos, MEX
Cloruro de potasio	Karal Reactivos Analíticos, MEX
Cloruro de sodio	J.T. Baker. USA; Karal Reactivos Analíticos, MEX
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	USB, USA
EDTA	Phyto Technology Lab. USA
Enzimas de restricción	Promega, Roche y New England Biolabs. USA
Etanol 96%	Industrial Kem de León S.A. de C.V. México
Extracto de levadura	Fluka, USA
Fenol	Invitrogen, USA
Fosfato de potasio	J.T. Baker. USA
Fosfato de potasio dibásico	Karal Reactivos Analíticos, MEX
Fosfato de potasio monobásico	Karal Reactivos Analíticos, MEX

Glicerol	USB, USA
Glicina	Riedel de Haen. USA
HEPES	
Hidróxido de potasio (KOH)	Karal Reactivos Analíticos, MEX
Hidróxido de sodio	Industrial Kem de León S.A. de C.V. México.
Higromicina B	Sigma Chemical Co. USA
Hipoclorito de sodio	Cloralex, México
Isopropanol	Industrial Kem de León S.A. de C.V. México
Kit Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific
Leche descremada	Svelty, Nestle. USA
Marcador de ADN de 1 kb	Invitrogen, USA
Marcador de ADN de 100 pb	Invitrogen, USA
p_Nitro fenil fosfato	Sigma Chemical Co. USA
Persulfato de amonio (APS)	IBI Scientific, USA
RNAsa	Roche, USA
Spectinomicina	Sigma Chemical Co. USA
Sulfato de magnesio	Sigma Chemical Co. USA
Sulfato de magnesio heptahidratado	Herschi Trading, MEX
Sulfato de manganeso	Sigma Chemical Co. USA
Sulfato de manganeso monohidratado	Phytotechnology Laboratories, USA
Triptona	Phytotechnology Laboratories, USA
Tris base	Promega, USA
Tween 20	Sigma Chemical Co. USA

B) EQUIPO

1. Agitador orbital de mesa con plataforma Daigger modelo MX2139E
2. Autoclave eléctrica Sterilmatic modelo STM-E tipo C
3. Balanza analítica eléctrica Scientech modelo SA210D
4. Balanza granataria Ohaus modelo 1400
5. Baño María digital Fisher Scientific modelo Isotemp 1025
6. Cámara bioclimática Lumistell modelo Mac-510
7. Cámara de electroforesis horizontal BIO-RAD modelo minisub-cell GT
8. Campana de extracción de humos Fischer Alder modelo CS línea 2000
9. Campana de flujo laminar Fisher Alder
10. Campana de flujo laminar Lumistell modelo L-120
11. Campana de flujo laminar Lumistell modelo LP-09

12. Centrifuga refrigerada Kendro modelo Hareus Biofuge fresco
13. Centrifuga Sorvall modelo RC 5C Plus
14. Congelador Nieto modelo CVC15
15. Cuarto de incubación de cultivos vegetales Lumistell
16. Electroporador BTX modelo ECM 630
17. Espectrofotómetro Beckman modelo DU 530
18. Fluorómetro TECAN modelo Genios
19. Fotodocumentador de geles UVP modelo EpiChemi3 Darkroom
20. Fuente de poder Thermo EC modelo EC105
21. Horno de microondas LG modelo MS-217XQE
22. Incubadora shaker New Brunswick Scientific modelo 12400
23. Lector de microplacas BIO-RAD modelo 550
24. Microcentrifuga Eppendorf modelo mini Spin 59
25. Micropipetas Gilson
26. Placa de calentamiento Corning modelo PC420
27. Potenciómetro Orion 3 Star Thermo Electro Corporation
28. Refrigerador Torrey modelo R-14
29. Sonificador
30. Termociclador Techne modelo Touchene Gradient
31. Termociclador DNA Engine Bio Rad
32. Termomezclador R Eppendorf modelo 22331
33. Ultracongelador Nuair modelo UN-6613A35
34. Vórtex Fisher Scientific modelo Genie-2