UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

Plataforma para el despliegue de péptidos en nanotubos de VP6 de rotavirus

TESIS

PRESENTA

EDITH BARBA HERNÁNDEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. ARTURO LIÑAN TORRES

COMITÉ TUTELAR:

Dra. CARMEN NINA PASTOR COLÓN

(Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM)

Dr. FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA

(Facultad de medicina, UAEM)

M. en C. ANA RUTH PASTOR FLORES

(Instituto de Biotecnología, UNAM)

Dr. RAMÓN ANTONIO GONZALEZ GARCÍA CONDE

(Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM)

Cuernavaca, Morelos Enero 2026

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Ingeniería de Bioprocesos y Nanobiotecnología del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, en el Instituto de Biotecnología (IBt) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); bajo la dirección del M. en C. Arturo Liñan Torres. Durante la realización de este proyecto se contó con el financiamiento de PAPIIT UNAM IT202824.

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mi mamá, mi papá, mi hermano y hermana, sin ellos no podría haber llegado tan lejos, espero que sea un recordatorio de que todo lo que hacen por mí o por otros, ayuda a que sigan avanzando.

A todos los científicos que se encuentran iniciando, espero que esta tesis pueda ser una inspiración, que sus ansias de seguir investigando en este mundo y sus secretos puedan llevarnos a un mejor futuro.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por permitirme prepararme y presentar este proyecto, por permitirme estar en las instituciones que me formaron, por poner en mi vida a personas que me edifican, me corrigen cuando es necesario y están para mí.

Al M.C. Arturo Liñan, mi tutor, quien me dio las herramientas necesarias para desarrollarme en el laboratorio y como profesionista.

Al Dr. Tonatiuh Ramírez y a la Dra. Laura Palomares por permitirme formar parte del laboratorio.

A los técnicos académicos M.C. Ruth Pastor, M.C. Julio César, M.C. Martha Contreras y M.C. Vanessa Hernández, por todo el apoyo que me han brindado en cada uno de los pasos de este proyecto, por sus consejos y por ayudarme a crecer como persona y profesionista.

Gracias a los miembros de mi comité tutoral, la Dra. Nina Pastor, el Dr. Ramón González y el Dr. Fernando Esquivel, por su apoyo en el desarrollo del proyecto y sus recomendaciones para este trabajo.

A la Dra. Guadalupe Zavala de la unidad de microscopía electrónica por su ayuda en la obtención de micrografías, a la M.C. Lorena Hernández de la Unidad de Proteómica por su asesoría y apoyo en el proceso de bioconjugación. A la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBt, quienes facilitaron la obtención de los oligonucleótidos necesarios y la secuenciación de las diversas muestras enviadas.

A la Lic. Karin Levy y a la Biol. Larisa Campos, del grupo Palomares-Ramírez (GPR), por el apoyo administrativo y las atenciones brindadas.

Gracias al laboratorio 10 del IBt UNAM, a Anayeli, Lidia, Alberto, Andy, Diego, Sergio, Dani, Wendy, y Paz, por apoyarme en los experimentos, resolver mis dudas, darme consejos valiosos para continuar y brindarme una valiosa amistad.

Gracias a mi familia; a mi mamá Cecilia por siempre estar presente en mi vida y ser mi más grande apoyo, a mi papá Victor por siempre estar para mí y escucharme cuando lo necesitaba, a mi hermano Marcos por ser quien me cuida, me resuelve dudas y me anima, y gracias a mi hermana Noemi por ser mi mejor consejera y guiarme siempre.

Gracias a mis abuelitos Antonio y Victoria, a mis tíos Toño, Oli, Mayo, a mis primos Valeria, Aldahir y Diego por estar en disposición de ayudarme siempre en todas las diferentes etapas de mi vida.

Gracias a los vecimigos, Sebastián, Irán, Lupita, Jenny, Miriam, Doña Mary y Don Ale que se han preocupado tanto por mí.

Gracias a mis amigas Karo e Isa por ser mis confidentes y alegrar mis días.

Gracias a Litzy por ayudarme a superar retos y mostrarme un mundo de posibilidades.

Gracias a Ximena, Paola, Eymi, Aliandi y Paula, son el mejor descubrimiento de la universidad, gracias por ser las maravillosas personas que son.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA ..... **III**

AGRADECIMIENTOS ..... **IV**

ÍNDICE GENERAL ..... **VI**

ÍNDICE DE FIGURAS ..... **IX**

ÍNDICE TABLAS ..... **XI**

ÍNDICE DE ECUACIONES ..... **XII**

ABREVIATURAS ..... **XIII**

RESUMEN ..... **XIV**

1.- INTRODUCCIÓN 1

1.1.- Rotavirus *1*

1.2.- VP6 ..... *2*

1.2.1.- Polimorfismo de VP6 2

1.3.- Despliegue de péptidos en PPVs *3*

1.3.1.- Métodos para el despliegue de péptidos: Bioconjugación 4

1.3.2.- Métodos para el despliegue de péptidos: Ingeniería genética 5

1.4.- Sistema de expresión células de insecto-baculovirus (SCI-BV) *5*

1.5.- Despliegue de péptidos en VP6 de rotavirus *7*

1.6.- Uso de nanotubos de VP6 (NTVP6) *10*

2.- JUSTIFICACIÓN 11

3.- HIPÓTESIS 13

4.- OBJETIVOS 13

4.1.- General *13*

4.2.- Específicos *13*

5.- MATERIALES Y MÉTODOS 14

5.1.- Cultivo celular *14*

5.2.- Baculovirus recombinante VP6 ..... *1*

5.3.- Ensayo en placa para aislamiento de placa viral *1*

5.4.- Amplificación de stocks virales *3*

5.5.- Titulación viral *3*

5.6.- Producción de NTVP6 ..... *5*

5.6.1.- Condiciones iniciales para la optimización 6

5.7.- Purificación de NTVP6 ..... *8*

5.8.- Cuantificación de proteína *9*

5.9.- SDS-PAGE y Western blot *10*

5.10.- Microscopía electrónica de transmisión (MET) *12*

5.11.- Dispersión dinámica de luz (DLS) *12*

5.12.- Bioconjugación *13*

5.12.1.- Selección de péptidos 13

5.12.2.- Agente de entrecruzamiento 14

5.12.3.- Condiciones para bioconjugación 15

5.12.4.- Ecuaciones para determinar la relación NTVP6-péptidos 17

5.13.- Clonación de plásmidos y transformación bacteriana *19*

5.13.1 Amplificación del gen VP6 19

5.13.2.- Obtención del fragmento G15 20

5.13.3.- Plásmido pJET1.2_G15 20

5.13.4.- Metodología general para transformación bacteriana 21

5.13.5.- Ligación in vitro de G15 y VP6 23

6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN 26

6.1.- Producción de NTVP6 ..... *26*

6.1.1.- Producción de *stock* bacVP6 26

6.1.2.- Producción de NTVP6 28

6.1.3.- Metodología inicial para optimización de producción de VP6 33

6.2.- Bioconjugación ... *43*

6.2.1.- Ensayo preliminar para bioconjugación ... 43

6.2.2.- Ensayo de bioconjugación probando péptidos y NTVP6 diferentes ... 45

6.3.- Construcción del plásmido pJET1.2_VP6-G15 ... *49*

6.3.1.- Obtención de gen VP6 ... 49

6.3.2.- Clonación de fragmento G15 en pJET1.2 ... 50

6.3.3.- Inserción de fragmento G15 en VP6 ... 51

7.- CONCLUSIONES ... 54

8.- PERSPECTIVAS ... 55

9.- BIBLIOGRAFÍA ... 56

10.- ANEXOS ... 65

10.1.- Condiciones previamente reportadas sobre la producción de NTVP6 ... *65*

10.2.- Comparación entre secuencias NCDV y SA11 ... *66*

10.3.- Secuencia de gen VP6 ... *67*

10.4.- Secuencia del plásmido pJET1.2-RBS_VP6 ... *68*

10.5.- Plásmido pSB1T3-VP6 ... *68*

10.6.- Caracterización de NTVP6 (c+) ... *69*

10.7.- Resultados de análisis de pellet ... *70*

10.8.- Segunda producción de NTVP6 ... *71*

10.9.- Tercera producción de NTVP6 ... *72*

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de rotavirus. 1

Figura 2. Monómero y trímero de VP6 de rotavirus. 2

Figura 3. Diagrama de fases de VP6 (pH vs Fuerza iónica). 3

Figura 4. Generación de baculovirus recombinante y expresión génica con el sistema de expresión Bac-to-Bac. 6

Figura 5. Nanoestructuras formadas por VP6. 7

Figura 6. Sitios de inserción en VP6. 8

Figura 7. Ejemplo de curva estándar de BSA. 10

Figura 8. Mecanismo de reacciones sugerido para reactivo AMAS. 14

Figura 9. pJET1.2-RBS_VP6. 19

Figura 10. pJET1.2_G15. 21

Figura 11. Construcción de vector pJET1.2_VP6-G15 por metodología B 25

Figura 12. WB con anti-VP6 de las placas aisladas de bacVP6. 26

Figura 13. Curva de titulación viral de bacVP6. 27

Figura 14. Cromatogramas de la purificación de NTVP6. 29

Figura 15. Caracterización de primera producción de NTVP6. 30

Figura 16. Caracterización de NTVP6 obtenidos por primera producción. 32

Figura 17. Gráficas de viabilidad correspondientes a tratamientos para optimización. 34

Figura 18. Gráficas de crecimiento correspondientes a tratamientos para optimización. . 35

Figura 19. WB del sobrenadante clarificado obtenido durante la cinética de optimización de la producción de la proteína VP6. 36

Figura 20. Cromatogramas de purificación. 40

Figura 21. SDS-PAGE y WB de la purificación de NTVP6 optimizados. 41

Figura 22. Caracterización de NTVP6 en condiciones optimizadas. 43

Figura 23. WB anti-VP6 del ensayo preliminar de bioconjugación. 44

Figura 24. Pruebas de bioconjugación analizadas por SDS-PAGE. 45
Figura 25. Caracterización de la segunda prueba de concepto de Bioconjugación. 46
Figura 26. Evaluación de la reactividad de anticuerpos frente a RBD y proteína Spike. ... 48
Figura 27. Análisis de restricción de plásmidos pJET1.2-RBS_VP6 (A) y pSB1T3_VP6 (T). 49
Figura 28. Alineamiento de la secuencia del gen VP6. 50
Figura 29. Clonación de fragmento G15 en pJEt1.2 51
Figura 30. Amplificación y ligación in vitro del gen de VP6 y fragmento G15 52
Figura 31. Clonación del Fragmento VP6-G15 en pJET1.2..... 53
Figura 32. Alineamiento de gen VP6-G15. 53
Figura A1. Plásmido pSB1T3-VP6 68
Figura A2. Caracterización de muestras de NTVP6 del 2018 70
Figura A3. WB de pellet colectado en cinética para optimización de producción VP6 70
Figura A4. Análisis del proceso de purificación de la segunda producción..... 71
Figura A5. Análisis de muestras obtenidas en proceso de purificación. 72
Figura A6. Caracterización de tercera producción 73

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Despliegue de péptidos en VP6 9

Tabla 2. Condiciones probadas para producción de VP6..... 7

Tabla 3. Péptidos seleccionados para bioconjugación. 14

Tabla 4. Condiciones utilizadas para evaluar la bioconjugación..... 16

Tabla 5. Oligonucleotidos utilizados para clonación, amplificación y secuenciación. 19

Tabla 6. Fragmento sintetizado para la inserción de péptido de SARS-CoV-2..... 20

Tabla 7. Enzimas utilizadas para ingeniería genética. 23

Tabla 8. Títulos virales de los pases 1 y 2 de bacVP6. 27

Tabla 9. Condiciones de producción de VP6 y resultados obtenidos. 31

Tabla 10. Cuantificación relativa de tratamientos. 37

Tabla 11. Condiciones y resultados obtenidos a partir de tercer y cuanta producción 39

Tabla A1. Condiciones reportadas para la producción de NTVP6..... 65

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Cálculo de densidad celular 14

Ecuación 2. Cálculo de Factor de dilución 1

Ecuación 3. Cálculo de viabilidad celular 1

Ecuación 4. Modelo sigmoide logístico de cuatro parámetros. 5

Ecuación 5. Dosis letal media de stock viral. 5

Ecuación 6. Dosis infecciosa media de Stock viral. 5

Ecuación 7. Cálculo de título viral. 5

Ecuación 8. Cálculo de rendimiento 6

Ecuación 9. Cálculo de área superficial de los NTVP6 (A_{NT}). 17

Ecuación 10. Área superficial de trímero de VP6 (A_{tr}) 17

Ecuación 11. Trímeros obtenidos por NTVP6 (N_{tr}) 17

Ecuación 12. Monómeros estimados por NTVP6 (N_{mon}) 17

Ecuación 13. Masa molecular de un monómero de VP6 (m_{mon}) 17

Ecuación 14. Masa total por NTVP6 (m_{NT}) 18

Ecuación 15. Cantidad de NTVP6 / µg (N_{NT}) 18

Ecuación 16. Número de C197 / µg de NTVP6 18

Ecuación 17. Moles necesarios de péptidos para la bioconjugación 18

Ecuación 18. Masa de péptido S2 necesarios por µg de NTVP6 18

Abreviaturas

AcM	Anticuerpos monoclonales
AMAS	N-α-maleimidoacetoxysuccinimida ester
bacVP6	Baculovirus recombinante con el gen de VP6
BSA	Albumina de suero bovino
C+	Control positivo
CEM	Cromatografía de exclusión molecular
CIA	Cromatografía de intercambio aniónico
DMSO	Dimetil sulfóxido
E. coli	*Escherichia coli*
h	Hora
hpi	Hora post infección
kDa	Kilo Dalton
LB	Caldo de lisogenia (Lysogeny Broth)
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
NTVP6	Nanotubo de VP6
MDI	Multiplicidad de infección
min	Minuto
mL	Mililitro
µL	Microlitros
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difenil tetrazolio
PA	Conjugado péptido-AMAS
PAN	Conjugado péptido-AMAS-NTVP6
PPV	Partícula pseudo viral
polH	Promotor de polihedrina
rpm	Revoluciones por minuto
SCI-BV	Sistema célula de insecto-baculovirus
SARS-CoV-2	Coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo de tipo 2
Proteína S	Proteína spike
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
Sf	*Spodoptera frugiperda*
SFB	Suero fetal bovino
MET	Microscopía electrónica de transmisión
TA	Temperatura ambiente
TFA	Ácido trifloro acético
TFF	Filtración Tangencial
TDI	Densidad celular al momento de la infección
UFP	Unidad formadora de placa
WB	Western blot

RESUMEN

El rotavirus, principal agente causal de la gastroenteritis aguda en infantes, cuenta con la proteína estructural VP6, la cual posee la capacidad natural de autoensamblarse en nanoesferas o nanotubos. Esta proteína estructural comparte características con diversas proteínas virales que al autoensamblarse forman partículas pseudo virales (PPVs), estructuras no infecciosas que tiene la capacidad para transportar y proteger péptidos mediante bioconjugación o ingeniería genética (Chung et al., 2020; Hadj Hassine et al., 2024; Knipe & Howley, 2013; Lepault et al., 2001; Peralta et al., 2009).

En este estudio se propone el despliegue de péptidos del coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo de tipo 2 (SARS-CoV-2, por sus siglas en inglés) sobre la superficie de nanotubos de VP6 (NTVP6) mediante bioconjugación. Para ello, se produjeron, purificaron y caracterizaron los NTVP6 utilizando el sistema baculovirus-células de insecto, con células de *Spodoptera frugiperda* (*Sf9*) cultivadas en medio PSFM, condiciones no exploradas en conjunto previamente, por lo cual se determinó que una densidad celular al momento de la infección (TDI, por sus siglas en inglés) de 4×10^6 células/mL y una multiplicidad de infección de 5 UFP/célula favorecen la producción de VP6.

Para la bioconjugación se empleó el crosslinker AMAS (N-α-maleimidoacetoxysuccinimida ester), que permite unir péptidos con grupos amina primaria a residuos sulfhidrilo de VP6. Se evaluó la conjugación de dos péptidos (MIAQYTSAL y TSNFRVQPTESIVRF) mediante Western blot, dispersión dinámica de luz y microscopía electrónica de transmisión. Adicionalmente, se realizó un ensayo para el despliegue de péptidos mediante ingeniería genética, donde se buscó insertar la secuencia del péptido TSNFRVQPTESIVRF en el gen de VP6. Para esto se obtuvieron dos plásmidos, pFastBac1-VP6 y pJET1.2-G15.

Este trabajo aporta a la optimización de la producción de NTVP6 y su evaluación como plataforma para el despliegue de péptidos con potencial aplicación en vacunas o sistemas de liberación de antígenos.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Rotavirus

Los rotavirus pertenecen a la familia *Reoviridae* y poseen un genoma de 11 segmentos de ARN de doble cadena. Son el principal agente causal de la gastroenteritis aguda en infantes (Knipe & Howley, 2013).

La partícula viral está conformada por seis proteínas estructurales; VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7 (VP, por sus siglas en inglés) y cinco proteínas no estructurales; NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5/6 (NSP, por sus siglas en inglés), cada una codificada por un segmento distinto del genoma (Knipe & Howley, 2013) (Figura 1).

El virión presenta una cápside de triple capa con un diámetro aproximado de 100 nm. Esta se conforma por dímeros de VP2 en la capa interna, trímeros de VP6 en la capa intermedia y, en la capa externa, por las proteínas VP7 y VP4. Esta última puede sufrir proteólisis, dando origen a VP5 y VP8 (Mathieu et al., 2001).

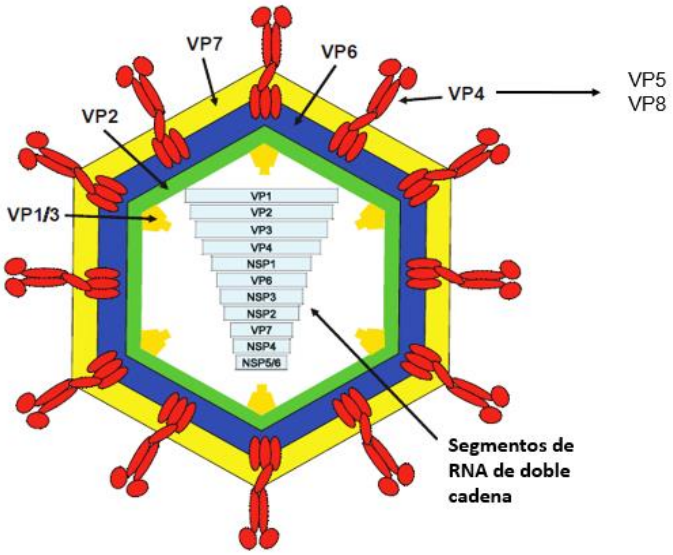


Figura 1. Estructura de rotavirus. Representación de las proteínas que componen el virión: VP2 forma la cápside interna, VP6 la cápside intermedia y VP7 la cápside externa. VP4 es la proteína de la espícula, que puede sufrir proteólisis dando lugar a VP5 y VP8, las cuales participan en la unión y entrada a la célula (adaptado de Knipe & Howley, 2013).

1.2.- VP6

La proteína estructural VP6 pesa aproximadamente 45 kDa y está compuesta por 397 aa, que se ensamblan en trímeros estables para formar la capa intermedia del virión. Su estructura se divide en dos dominios (Figura 2); el dominio head (H), formado por los residuos 151-334, plegado en ocho cadenas de hojas-β que participan en la unión con la proteína VP7 y VP4; y el dominio base (B), conformado por ocho α-hélices que comprenden los residuos 1-150 y 335-397, y bucles flexibles que participan en la asociación con VP2 (Knipe & Howley, 2013; Mathieu et al., 2001).

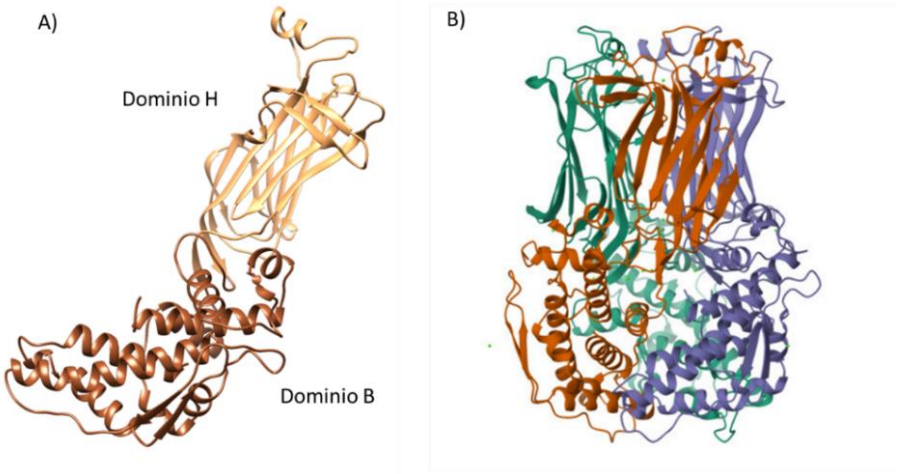


Figura 2. Monómero y trímero de VP6 de rotavirus. (A) Monómero de VP6 de rotavirus se resaltan en café los residuos 1-150 y 331-397 pertenecientes al dominio B, y en dorado los residuos 151-330 pertenecientes al dominio H. (B) Trímero de VP6, donde cada monómero está marcado por un color diferente (tomado de PDB 1QHD).

1.2.1.- Polimorfismo de VP6

La expresión y ensamblaje in vitro de proteínas estructurales virales con capacidad natural de autoensamblaje permite la formación de complejos proteicos denominados partículas pseudovirales (PPVs) (Hadj et al., 2024). Estas partículas carecen de genoma viral, por lo que no son infecciosas ni replicativas (Peralta et al., 2009).

Los monómeros de VP6 pueden asociarse formando hexámeros que posteriormente se autoensamblan en nanoestructuras esféricas o tubulares. La estructura resultante depende de factores como el pH, la fuerza iónica y la concentración de cationes (Figura 3) (Erk et al., 2003; Lepault et al., 2001; Mathieu et al., 2001).

El factor más relevante para la formación de estos complejos es el pH, debido a que en valores menores a 3 de pH se encontrarán trímeros de VP6; en un rango de 3.0 a 5.5, se forman partículas esféricas de diversos diámetros; sin embargo, si el pH del medio es mayor a 5.5 se formarán nanotubos; entre 5.5 a 7.0 los nanotubos tendrán un diámetro de 75 nm, mientras que a un pH mayor a 7.0 los nanotubos que se forman tendrán un diámetro de 45 nm (Lepault et al., 2001).

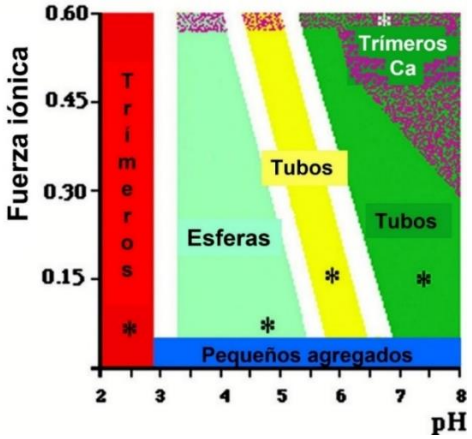


Figura 3. Diagrama de fases de VP6 (pH vs Fuerza iónica). En rojo: trímeros, menta: esferas, amarillo: tubos de 75 nm de ancho y en verde: tubos de 45 nm de ancho (Adaptado de Lepault *et al.*, 2001).

1.3.- Despliegue de péptidos en PPVs

Las PPVs se utilizan para la entrega de biomoléculas o fármacos, ya que éstas son acarreadores naturales y protectores de la carga, también presentan baja toxicidad, estabilidad estructural, capacidad para evadir la degradación y cuentan con proteínas que interactúan de manera específica con receptores celulares, favoreciendo su internalización (Chung et al., 2020; Lei et al., 2020)

Las PPVs pueden funcionalizarse mediante la encapsulación, adsorción o conjugación de péptidos en regiones accesibles de su cápside, como sitios de interacción a otras proteínas, regiones N-terminal, C-terminal o *loops*. Esta funcionalización incrementa la inmunogenicidad de las PPVs en comparación con la proteína monomérica o el péptido libre (Chen et al., 2020; Chung et al., 2020; Ding et al., 2018; Lei et al., 2020).

1.3.1.- Métodos para el despliegue de péptidos: Bioconjugación

La bioconjugación es una estrategia utilizada para el despliegue de péptidos en PPVs. Consiste en la unión química, entre dos moléculas, de las cuales una es una biomolécula y se asocia generalmente por enlace covalente a otra biomolécula o a moléculas inorgánicas (Hermanson, 2013; Lei et al., 2020).

Esta modificación química utiliza los grupos funcionales (grupos amina, carboxilo, sulfhidrilos, etc.) que se encuentran en la superficie interior o exterior de la proteína, asociándolos generalmente por enlaces covalentes con la molécula o péptido a conjugar (Chung et al., 2020; Ding et al., 2018). Dentro de las estrategias utilizadas se encuentran los acoplamientos tipo Michael, como las reacciones maleimida-tiol, utilizadas para la funcionalización dirigida a residuos de cisteína (Brune & Howarth, 2018; Ding et al., 2018).

La bioconjugación incluye procesos como el entrecruzamiento o la modificación de superficie. Al proceso de unir químicamente dos o más moléculas por enlaces covalentes se le conoce como entrecruzamiento (*crosslinking*). Esta reacción química sucede gracias a agentes que cuentan con extremos que reaccionan con grupos funcionales específicos (Thermo Scientific, 2012).

Los agentes de entrecruzamiento se pueden clasificar como homobifuncionales o heterobifuncionales. El primero es un tipo de agente que cuenta con los mismos grupos reactivos en los extremos de la molécula, mientras que el heterobifuncional es aquel que en cada extremo de la molécula cuenta con diferentes grupos reactivos, proporcionando mayor selectividad y permitiendo acoplar moléculas con

diferentes grupos funcionales (Chung et al., 2020; Ding et al., 2018; Thermo Scientific, 2012).

1.3.2.- Métodos para el despliegue de péptidos: Ingeniería genética

Además de la bioconjugación, la ingeniería genética es otra forma de desplegar péptidos en la superficie de las PPVs, permitiendo su incorporación directa mediante la modificación del gen que codifica la proteína viral, introduciendo secuencias de péptidos ajenos en regiones tolerantes para estas inserciones como los extremos N-terminal, C-terminal o loops expuestos, sin alterar significativamente su conformación (Lei et al., 2020).

Existen diversas formas para realizar las modificaciones genéticas de una manera más precisa, por ejemplo la recombinación homologa (HR), el sistema CRISPR (clusters regularly interspaced short palinfromic repeats) y BRED (Bacteriophage Recombineering of Electroporated DNA), utilizadas para producir fagos modificados para diversos usos (Hussain et al., 2023). Al realizar la fusión de las secuencias de los péptidos a la proteína viral, las PPVs resultantes de la expresión de estas proteínas modificadas despliegan los péptidos de manera ordenada tras su autoensamblaje, y son capaces de funcionar como vacunas bivalentes o multivalentes (Lei et al., 2020).

1.4.- Sistema de expresión células de insecto-baculovirus (SCI-BV)

Uno de los sistemas más empleados para la expresión de proteínas recombinantes es el sistema de células de insecto-baculovirus (SCI-BV). Este sistema utiliza baculovirus recombinantes, generalmente el nucleopoliedrovirus de *Autographa californica* (AcMNPV), que infectan células de insecto cultivadas *in vitro* para expresar genes de interés bajo promotores fuertes como polH o p10. En este contexto, el gen de polihedrina se reemplaza por el transgén, alcanzando niveles de expresión que representan entre el 30 y 50% de la proteína total celular (Mena et al., 2006; L. Palomares et al., 2006; Rohrmann, 2013; Ruffing et al., 1992; Urabe et al., 2002).

Las líneas celulares más utilizadas son *Sf9* y *Sf21* de *Spodoptera frugiperda* y *High Five*® de *Trichoplusia ni* (Aucoin et al., 2006;Palomares et al., 2002). Entre las ventajas de SCI-BV destacan: cultivo e infección en suspensión facilitando el escalamiento, realización de modificaciones postraduccionales funcionales, expresión simultanea de uno o varios genes de alto peso molecular, altos niveles de proteína recombinante y uso de medios sin suero (O'Reilly & A, 1994;Palomares et al., 2006).

El proceso de producción se realiza mediante sistemas como Bac-to-Bac® (Invitrogen, 2002) que incluyen construcción del vector de transferencia, generación de bácmidos recombinantes, transfección de células de insecto, selección de clonas altamente productoras y producción final de proteínas al infectar el cultivo de células de insecto con baculovirus recombinante, como se muestra en la figura 4. (Invitrogen, 2002; Palomares et al., 2012).

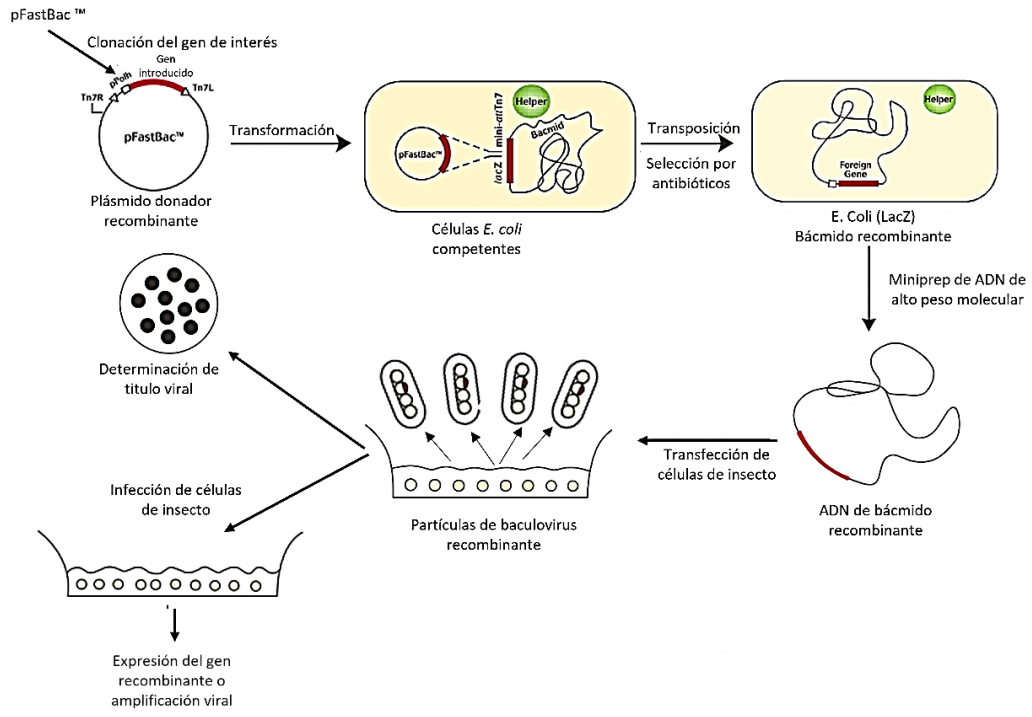


Figura 4. Generación de baculovirus recombinante y expresión génica con el sistema de expresión Bac-to-Bac. Adaptado de Invitrogen (2002).

La producción óptima de PPVs o vectores recombinantes depende de múltiples parámetros: multiplicidad de infección (MDI), tiempo de infección, fase de crecimiento, edad del cultivo, tiempo de cosecha y composición del medio (Hu & Bentley, 2001; Licari & Bailey, 1992).

1.5.- Despliegue de péptidos en VP6 de rotavirus

Las nanoestructuras conformadas por VP6 (Figura 5) se han utilizado como plataforma para el despliegue de péptidos y proteínas. Dicho despliegue puede lograrse mediante bioconjugación mediada por péptidos de unión (Frenchick et al., 1992; Redmond et al., 1991) o linkers (Scinto et al., 2021; Thermo Scientific, 2012) , o a través de ingeniería genética (Gröhn et al., 2021; Pan et al., 2016; Peralta et al., 2009).

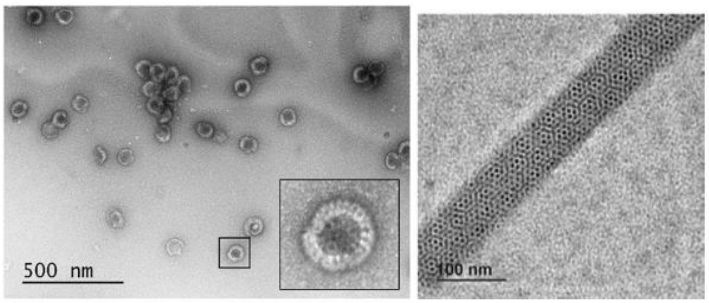


Figura 5. Nanoestructuras formadas por VP6. Imágenes tomadas por microscopia electrónica de transmisión (MET) Nanoesferas de VP6 (izquierda) a 10,000 x. Nanotubos de VP6 (derecha) a 50,000 X, teñido con 1% de acetato de uranilo (tomado de Tamminen et al., 2020; Rodríguez et al., 2021).

La bioconjugación ha demostrado ser un enfoque altamente eficiente. Se ha documentado la unión de péptidos sintéticos al ensamblaje esférico de VP6 mediante interacciones proteína-péptido, sin necesidad de reactivos químicos, utilizando fragmentos derivados de la proteína VP4 como péptido de anclaje, estos conjugados generaron respuestas inmunes significativamente mayores y más duraderas en comparación con la administración de los péptidos libres (Frenchick et al., 1992). De forma similar, Redmond y colaboradores (1991) demostraron que las esferas de VP6 podían acoplar tanto péptidos virales de rotavirus y herpes virus, como péptidos no virales, incluyendo hormonas como la somatostatina, realizando

el acoplamiento mediante conjugación química utilizando un *crosslinker* denominado carbodiimida (EDAC).

Por otra parte, la ingeniería genética se ha utilizado para el despliegue de diversos péptidos, insertando las secuencias peptídicas entre los residuos 171-172, 301-308, 311-312 (Figura 6), o en los extremos N-terminal y C-terminal, utilizando secuencias conocidas como linkers para brindar estabilidad a la inserción del péptido en la secuencia de VP6. Ejemplos de esto son el despliegue del epítopo V5 parte de la fosfoproteína del paramixovirus de simio 5 (Peralta et al., 2009), péptidos de poliovirus provenientes de los sitios antigénicos encontrados en las proteínas estructurales VP1, VP2, y VP3 (Pan et al., 2016), o péptidos derivados tanto de la proteína M2 como de la hemaglutinina de influenza (Gröhn et al., 2021). La longitud de los péptidos insertados en esta proteína ha variado dependiendo del sitio seleccionado para insertar, siendo posible insertar desde 14 aa entre los aminoácidos 171-172 (Peralta et al., 2009), hasta 222 aa en las regiones terminales (Gröhn et al., 2021) como se muestra en la tabla 1.

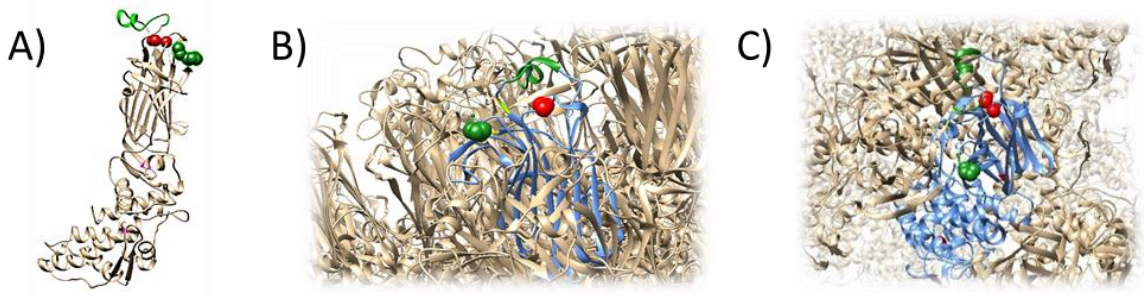


Figura 6. Sitios de inserción en VP6. A) Monómero de VP6. B) Vista lateral y C) vista superior de la nanoesfera de VP6 (monómero en azul). Cys197 en rojo; se marcan en verde los residuos 171-172 (esfera), 301-308 y 311-312 (esqueleto de carbonos). Estructuras tomadas de PDB 1QHD y 3KZ4 .

Tabla 1. Despliegue de péptidos en VP6

Molécula desplegada		Longitud	Nanoestructura de VP6	Región de inserción	Referencia
Antígeno RBD de SARS-CoV-2		222 aa	Monómero	N-terminal	Tamminen et al., 2021
Epítopo V5 de paramixovirus de simio 5		14 aa	Trímeros (VP6) nanoesferas (VP6/VP2)	aa 171-172	Peralta et al., 2009
Péptido M2e del virus de influenza A		23 aa	Trímeros	aa 171, y N-terminal	Gröhn et al., 2020
Polipéptido del fragmento tallo de la hemaglutinina del virus de influenza A		140 aa	Trímeros	N-terminal y C-terminal	
Sitios antigénicos neutralizantes del poliovirus	VP1	14 aa	Monómero	aa 298	Pan et al., 2016
	VP1/VP2	12 aa	Monómero	aa 244	
	V1/VP2/VP3	15 aa	Monómero	aa 174	
Antígeno VP4 de Rotavirus		12 aa	Monómeros	aa 174	Teng et al., 2014
		16 aa	Monómeros	aa 197	
		18 aa	Monómeros	aa 298	

1.6.- Uso de nanotubos de VP6 (NTVP6)

Se ha demostrado que los nanotubos derivados de la proteína VP6 de rotavirus, son plataformas altamente versátiles en aplicaciones biomédicas y biotecnológicas (M. Malm et al., 2016; Plascencia-Villa et al., 2009; Tamminen et al., 2020).

Estos inducen fuertes respuestas inmunes, y brindan una mayor protección al antígeno cargo en comparación con los trímeros o las partículas de doble capa (Peralta et al., 2009). Asimismo, no presentan toxicidad en células mieloides, epiteliales o fibroblastos, y se ha reportado su internalización por células de origen mieloide (Rodríguez et al., 2014). En comparación con las partículas esféricas de VP6, los nanotubos muestran mayor estabilidad gracias a interacciones proteína-proteína más fuertes (Rodríguez-Galván et al., 2008).

Se ha reportado el uso de los NTVP6 para potenciar la inmunogenicidad de antígenos coadministrados y activar la respuesta inmune adaptativa. Esta capacidad inmunoestimuladora se ha visto asociada con su posible aplicación como adyuvante en formulaciones vacunales (M. Malm et al., 2016; Rodríguez et al., 2014; Shoja et al., 2022)

Por otra parte, los NTVP6 también pueden ser funcionalizados con metales como oro, paladio, plata y platino. Esta propiedad se debe a la afinidad de ciertos aminoácidos de VP6 por iones metálicos, incluyendo residuos polares como lisina, arginina e histidina, así como aminoácidos que contienen azufre como cisteína y metionina. Estas interacciones han sido aprovechadas en el diseño de sistemas híbridos bioinorgánicos con aplicaciones catalíticas y enzimáticas (Plascencia-Villa et al., 2009; Shoja et al., 2022).

2.- JUSTIFICACIÓN

Se han desarrollado diversas plataformas basadas en virus, como las PPVs, que permiten desplegar péptidos u otras biomoléculas mediante técnicas como la bioconjugación o la ingeniería genética. Estas plataformas son utilizadas para la entrega de medicamentos, diagnóstico de enfermedades, desarrollo de vacunas, remediación ambiental, entre otras aplicaciones (Kheirvari et al., 2023; Schwarz et al., 2017).

El uso de péptidos sintéticos o antígenos por sí solos como candidatos vacunales suele tener limitaciones, como presentar baja inmunogenicidad e inestabilidad estructural, reduciendo su efectividad (Boöttger et al., 2017; O'Rourke et al., 2014). Por ello, se han utilizado PPVs para su entrega, puesto que, no son infecciosas ni replicativas y permiten el despliegue de una alta densidad de antígenos, de igual manera las PPVs favorecen la estabilización de los péptidos y el reconocimiento de estos últimos por el sistema inmunológico (Kheirvari et al., 2023; Lei et al., 2020).

Aunque existen diversas plataformas basadas en PPVs con características atractivas para el despliegue de péptidos, aún es necesario explorar alternativas que aporten mayor estabilidad y faciliten la entrega de los péptidos a la célula. En este sentido, las nanoestructuras conformadas por VP6 de rotavirus presentan una opción prometedora, pues en específico los nanotubos de VP6 (NTVP6) destacan por su estabilidad y por su amplia superficie para el despliegue de péptidos. Además se ha demostrado que su tamaño y forma tubular son características clave que favorecen su internalización específica por células presentadoras de antígenos, pues solo los nanotubos y no otras conformaciones de VP6 fueron internalizados por macrófagos, lo cual potencia la inmunogenicidad de los péptidos transportados (Rodríguez et al., 2014; Rodríguez-Galván et al., 2008; Tamminen et al., 2021).

En este trabajo se propone utilizar NTVP6 como plataforma para el despliegue de péptidos, utilizando dos estrategias: la bioconjugación mediante la asociación química del péptido con la Cys197 de VP6, o por ingeniería genética insertando la

secuencia peptídica entre los residuos 171-172 de VP6. Como modelo se seleccionaron dos péptidos derivados de la proteína S de SARS-CoV-2: uno de 14 aa y otro de 9 aa. Ambos péptidos fueron tomados del proyecto de tesis doctoral del M. en C. Arturo Liñan (no publicada), donde fueron identificados *in silico* como epítopos potencialmente reconocidos por linfocitos T, con posible compatibilidad con el complejo mayor de histocompatibilidad de ratón. Se seleccionaron epítopos menores de 20 aa, ya que la fusión de péptidos de mayor longitud en otros virus de morfología tubular tiende a generar repulsión estérica que pueden afectar la formación y estabilidad de las partículas (Vaidya & Solomon, 2022). Además, en el trabajo de Peralta et al. (2009) se demostró que el despliegue de péptidos de 14 aa en la superficie de VP6, con el apoyo de la proteína VP2, permite la formación de nanoesferas, dando lugar a estructuras de mayor complejidad.

3.- HIPÓTESIS

Los nanotubos de VP6 de rotavirus pueden desplegar péptidos de 9 y 15 aminoácidos de la proteína S de SARS-CoV-2, empleando métodos de bioconjugación o ingeniería genética.

4.- OBJETIVOS

4.1.- General

Evaluar el despliegue de péptidos de la proteína S de SARS-CoV-2 sobre NTVP6 de rotavirus, mediante bioconjugación o ingeniería genética.

4.2.- Específicos

- Producir NTVP6 en el sistema de expresión células de insecto-baculovirus empleando células *Sf9*.
- Bioconjugar péptidos de la proteína S de SARS-CoV-2 en NTVP6 utilizando el linker N-α-maleimidoacetoxisuccinimida ester (AMAS).
- Diseñar y construir variantes de NTVP6 que expresen péptidos de la proteína S de SARS-CoV-2 insertados entre los residuos 171-172 de la proteína VP6 de rotavirus mediante ingeniería genética.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- Cultivo celular

En este proyecto se empleó la línea celular *Sf9,* para la producción, amplificación y titulación del baculovirus recombinante que expresa el gen de la proteína VP6 (bacVP6), así como la producción de la proteína VP6.

Para el aislamiento y titulación de bacVP6, las células fueron cultivadas en adherencia utilizando el medio SF-900 II SFM (GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, EUA). El aislamiento se realizó en placas de 6 pozos de fondo plano para cultivo celular (SPL Life Science), mientras que la titulación se llevó a cabo en placas de 96 pozos de fondo plano para cultivo celular (Costar, Corning Inc.).

En el caso del cultivo en suspensión empleado para el mantenimiento celular y la producción de proteína recombinante, se usó el medio PSFM (FUJIFILM, Wako), en agitación orbital con velocidad constante de 110 rpm, a una temperatura de 27 °C. Las células se mantuvieron en matraces de 250 mL, 500 mL y 1 L con volúmenes de trabajo de 50 mL, 150 mL y 300 mL, respectivamente. Se realizaron pases celulares a partir de cultivos en fase exponencial con densidad celular menores a 6 x 10^6 cel/mL y se subcultivaron a una densidad inicial de 0.6 x 10^6 cel/mL.

La concentración (Ecuación 1 y 2) y la viabilidad celular (Ecuación 3) fueron determinadas mediante una cámara de Neubauer y la técnica de exclusión con azul de tripano.

Ecuación 1. Cálculo de densidad celular

$$\delta = \frac{N}{\#\ cuadrícula} * \frac{1\ cuadrícula}{L * A * P} * \frac{1000\ mm^3}{1\ cm^3} * \frac{1\ cm^3}{1\ mL} * FD$$

Donde: δ = densidad celular, N = células totales contadas (vivas + muertas), # cuadrícula = cuadrículas contadas (se recomienda contar las 10), L = largo de cuadrícula (1 mm), A = ancho de cuadrícula (1 mm), P = profundidad de cuadrícula (0.1 mm), FD = factor de dilución.

Ecuación 2. Cálculo de Factor de dilución

$$FD = \frac{A + B}{A}$$

Donde: FD = factor de dilución, A = los µL de cultivo celular, B = los µL de azul de tripano.

Ecuación 3. Cálculo de viabilidad celular

$$\%viabilidad = \frac{Celulas\ vivas}{Celulas\ vivas + celulas\ muertas} * 100$$

5.2.- Baculovirus recombinante VP6

A partir de un *stock* de bacVP6 obtenido el 21 de mayo de 2018 se aislaron placas virales como se indica en la sección 5.3, las cuales posteriormente fueron propagadas en células *Sf9* cultivadas en medio PSFM, para después amplificarlo, titularlo y emplearlo en la producción de los NTVP6.

5.3.- Ensayo en placa para aislamiento de placa viral

A partir del *stock* de bacVP6 se realizó un ensayo en placa por medio del cual se aislaron placas virales individuales productoras de proteína VP6 en el SCI-BV.

Para este ensayo en una placa de seis pozos se colocaron 1.0 x 10^6 células por pozo, aforando con medio Grace´s a un volumen final de 2 mL por pozo. Esta placa se incubó por 1 h a 27 °C para permitir la adherencia de las células a la placa. Posteriormente en 5 tubos eppendorf de 1.5 mL se colocaron 900 µL de medio Grace´s sin suero fetal bovino (SFB), al primer tubo se le colocaron 100 µL del stock de bacVP6 y se mezcló por vórtex aproximadamente 15 s, de esta primer mezcla se tomaron 100 µL y se colocaron en el siguiente tubo, el cual se mezcló de la misma manera que el primero, el proceso se repitió hasta llegar al quinto tubo, del cual al final se descartaron 100 µL. Así se obtuvieron 900 µL de las diluciones 10^{-1} hasta 10^{-5} del baculovirus. Al finalizar el periodo de incubación se removieron los 2 mL de medio en la placa, dejando las células *Sf9* adheridas, y se agregaron los 900 µL de dilución viral, donde se colocó una dilución por cada pozo, esto se incubó durante 4

h a TA y en agitación de balanceo. Se dejó un pozo sin infectar como control de crecimiento del ensayo.

Posteriormente, se retiró la dilución viral y se agregaron 3 mL de medio de plaqueo (agarosa de bajo punto de fusión al 4%, medio Grace´s 2X y SFB, en una relación 1:0.8:0.2, respectivamente) a una temperatura de 37 °C. La placa se dejó durante 96 h a 27 °C en ambiente húmedo.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se adicionaron 2 mL de medio de plaqueo con rojo neutro (agarosa de bajo punto de fusión al 1.2%, agua estéril y rojo neutro al 1% en una relación 1 : 1 : 0.25, respectivamente) para formar una segunda capa. La placa se incubó a 27 °C durante 16 h en un ambiente húmedo sellado, generado colocando la placa dentro de una bolsa plástica junto con papel absorbente saturado de agua. Después de este periodo, se identificaron las placas aisladas de baculovirus con la ayuda de un microscopio invertido, donde cada placa viral fue marcada; posteriormente las placas seleccionadas fueron aspiradas con una micropipeta P-200. Los aspirados fueron resuspendidos individualmente en 900 µL de medio Grace´s, mezclando por vórtex cada uno de los tubos.

En una nueva placa de seis pozos se colocaron 1.0 x 10^6 células *Sf9* por pozo, diluidas en medio Grace´s a un volumen final de 2 mL por pozo. La placa se incubó durante 1 h a 2 7°C para permitir su adherencia. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio y en los pozos se colocaron los 900 µL de cada placa viral aislada. Las células se incubaron durante 4 h a TA en agitación por balanceo. Posteriormente, se adicionaron 2.2 mL de medio SF-900 II SFM a cada pozo y se incubó la placa en un ambiente húmedo sellado durante 96 h a 27 °C.

Finalizando este periodo, Se cosecharon 2.5 mL del sobrenadante de cada pozo, agregándoles SFB al 1%, y conservándolo a 4 °C. Los lisados celulares se evaluaron por Western blot (WB) para el análisis de expresión de proteína recombinante (sección 5.9), y el sobrenadante se usó para la amplificación del *stock* viral (sección 5.4).

5.4.- Amplificación de *stock*s virales

Posterior al análisis de expresión de proteína, la placa que mostró la producción de proteína recombinante (VP6) se seleccionó y se amplificó utilizando células *Sf9* cultivadas en matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de trabajo de 50 mL. Cuando se alcanzó una densidad celular entre 1 x 10^6 y 2 x 10^6 cel/mL, con una viabilidad mayor al 95%, fueron infectadas con 500 µL del sobrenadante obtenido de la placa seleccionada de bacVP6. Transcurridas 96 h post-infección (hpi), o cuando la viabilidad fue menor al 20%, el cultivo se cosechó y se centrifugó durante 10 min a 2000 g, colectando el sobrenadante clarificado, al cual se le adicionó 1% de SFB y fue conservado a 4 °C, protegido de la luz. Este fue denominado pase 1 y fue titulado de acuerdo a la sección 5.5.

Posteriormente se infectaron cultivos de células *Sf9* con una concentración entre 1 x 10^6 y 2 x 10^6 cel/mL, a una MDI de 0.1 unidades formadoras de placa por célula (UFP/cel). El sobrenadante clarificado se cosechó siguiendo el procedimiento descrito para el pase 1, obteniéndose el pase 2 de bacVP6, el cual se utilizó como pase de trabajo.

5.5.- Titulación viral

La titulación de los pases 1 y 2 de bacVP6 se realizó siguiendo la metodología descrita por Mena et al. (2003), basada en un ensayo de viabilidad celular utilizando el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difenil tetrazolio (MTT). Este método cuantifica la reducción en el número de células viables inducida por la infección viral, relacionándola con la absorbancia generada por los cristales de formazán producidos por la actividad deshidrogenasa mitocondrial. Debido a que el baculovirus es un virus lítico cuya replicación disminuye el crecimiento celular de manera dosis-dependiente.

Para esto en dos placas de 96 pozos se sembraron células *Sf9* a una concentración de 0.18 x 10^6 cel/mL en medio SF900-II, en un volumen final de 50 µL por pozo. Se prepararon tubos de 1.5 mL, en uno de ellos se agregaron 300 µL del stock sin diluir,

en los demás se colocaron las diluciones seriadas del *stock* viral a titular desde 10^{-1} hasta 10^{-10}. Para ello a cada uno se le agregó 900 µL de medio Sf-900, posteriormente al primer tubo (10^{-1}) se añadieron 100 µL del stock viral, se mezcló por vórtex durante 15 s y, posteriormente se transfirieron 100 µL al siguiente tubo para generar la siguiente dilución. Este procedimiento se repitió hasta obtener la dilución 10^{-10}.

Las diluciones de añadieron a la placa de 96 pozos utilizando una punta estéril para el repetidor (Eppendorf, Cat. 0030089634), la cual dispensa 10 µL en el ajuste “1”. Se inició por la mayor dilución (10^{-10}) y se continuó hasta el stock sin diluir. Cada dilución se distribuyó en dos columnas completas (16 pozos). Además, en dos columnas de la placa 1 solo se adicionó medio Sf-900 sin virus para tener pozos control.

Las placas se sellaron herméticamente con cinta *masking* y fueron incubadas durante 6 días a 27 °C en un ambiente húmedo sellado. Cuando finalizó el periodo de incubación, a cada pozo se le agregaron 10 µL de MTT a una concentración final de 5 mg/mL utilizando el repetidor y una punta previamente destinada al manejo del reactivo. Las placas se protegieron de la luz y se incubaron durante 2 h a TA en un agitador de vaivén.

Posteriormente, las placas se centrifugaron a 2000 rpm por 10 minutos, para sedimentar los cristales de formazán. El sobrenadante se retiró cuidadosamente utilizando un sistema de vacío conectado a un matraz exclusivo para residuos de MTT. Los cristales de formazán, producto de la actividad deshidrogenasa mitocondrial sobre el MTT, se solubilizaron añadiendo 50 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) por pozo, incubando hasta su dilución.

Finalmente, se usó un lector de microplacas (FLUOstar Omega, BMG Labtech) para medir la absorbancia a 570 nm de cada pozo. Con esta lectura se analizaron los datos de absorbancia para cada dilución viral y se ajustaron a un modelo sigmoide

logístico de cuatro parámetros (Ecuación 4), mediante el programa Sigmaplot 10.0 (SPSS, Chicago IL, USA).

A partir de la curva obtenida se calcula la dosis letal media del *stock* viral (TCLD50/mL) (Ecuación 5), valor utilizado para obtener el título viral (Ecuación 7). se estimó la dosis citopática media ($TCID_{50}$/mL), la cual se transformó a unidades formadoras de placa equivalentes (UFP/mL) utilizando la relación UFP/mL = $TCID_{50}$/mL × 0.69, basada en el supuesto estadístico de Poisson, obteniéndose así el título final des stock de baculovirus.

Ecuación 4. Modelo sigmoide logístico de cuatro parámetros.

$$Y = Y_0 + \frac{a}{1 + \left(\frac{X}{X_0}\right) b}$$

Donde Y representa la absorbancia, X la dilución del *stock* viral, Y_0 la absorbancia mínima, a la absorbancia máxima, b pendiente de la curva, X_0 dilución en la que se mostró un 50% de respuesta.

Ecuación 5. Dosis letal media de *stock* viral.

$$TCLD50\ /mL = \frac{1}{\frac{10^{-X_0}}{0.01} mL}$$

Ecuación 6. Dosis infecciosa media de Stock viral.

$$TCID50\ /mL = 0.912\ (\log TCLD50/mL) + 1.674$$

Ecuación 7. Cálculo de título viral.

$$\frac{UFP}{mL} = \frac{TCID50}{mL} * 0.69$$

5.6.- Producción de NTVP6

A partir del pase 2 de bacVP6, se llevó a cabo la infección de cultivos celulares para la producción de proteína recombinante. Las condiciones de infección iniciales fueron seleccionadas con base en reportes previos (anexos 10.1.), con esto se establece que se infectan a una densidad celular al momento de la infección (TDI) de $1x10^6$ cel/mL a una MDI de 0.5 UFP/cel. Se emplearon células *Sf9* cultivadas en medio PSFM, una combinación de línea celular y medio de cultivo no probados previamente para la producción de la proteína VP6.

El cultivo se realizó en matraces Erlenmeyer de 1 litro con un volumen de trabajo de 300 mL, incubados a 27 °C y 110 rpm, con una viabilidad celular mayor al 95%. Posteriormente los cultivos fueron cosechados por centrifugación a 4000 g durante 10 minutos a 4 °C, cuando la viabilidad celular se encontraba entre 40 y 60 %. El sobrenadante clarificado se conservó a 4 °C, asegurando condiciones estériles hasta su purificación (véase sección 5.7).

Posteriormente se calculó el rendimiento obtenido en estas condiciones (Ecuación 8), el cual se comparó con el rendimiento obtenido en diferentes condiciones (Anexo 10.1). Posteriormente se optimizó el proceso de producción (Sección 5.6.1.), para lo cual se seleccionó el tratamiento que proporcionó la mayor concentración de proteína VP6 para su escalamiento.

Ecuación 8. Cálculo de rendimiento

$$Rendimiento = \frac{proteína\ total\ obtenida\ (mg)}{volumen\ celular\ infectado\ (L)}$$

5.6.1.- Condiciones iniciales para la optimización

Para maximizar la producción de VP6, se realizó un diseño experimental con dos variables analizadas en tres niveles diferentes: una TDI de 1×10^6, 2×10^6 y 4×10^6 cel/mL; y MDI de 0.5, 2.5 y 5 UFP/cel (Tabla 2), manteniendo un volumen de trabajo de 20 mL. Estas condiciones fueron seleccionadas por ser parámetros que influyen en la productividad del SCI-BV (Hu & Bentley, 2001; Licari & Bailey, 1992; L. A. Palomares & Ramírez, 2001).

En cuanto a la MDI se seleccionaron tres valores distintos. El valor 0.5 UFP/cel, corresponde a condiciones reportadas previamente (Anexo 10.1), el valor de 5 UFP/cel se eligió tomando en cuenta que constituye una alta MDI, la cual produce una infección de aproximadamente el 99% de las células en el tiempo cero postinfección (Palomares & Ramírez, 2001) y 2.5 UFP/cel el cual fue seleccionado como un punto medio entre las dos primeras.

Se recolectaron muestras cada 24 h durante las cinéticas de infección y se analizaron por WB, evaluando la presencia de VP6 tanto en el sobrenadante (Figura 19) como en el pellet celular (anexo 10.7). Con estos análisis se comparó la producción de VP6 en cada tratamiento, lo que permitió identificar las condiciones óptimas de producción. A partir de estos resultados, se seleccionó una TDI de 2 × 10^6 cel/mL con una MDI de 2.5 UFP/cel.

Tabla 2. Condiciones probadas para producción de VP6**.**

Tratamiento	TDI (cel/mL)	MDI (UFP/cel)
1	4 x 10^6	5
2	4 x 10^6	2.5
3	4 x 10^6	0.5
4	2 x 10^6	5
5	2 x 10^6	2.5
6	2 x 10^6	0.5
7	1 x 10^6	5
8	1 x 10^6	2.5
9	1 x 10^6	0.5
10	4 x 10^6	0 (Control)
11	2 x 10^6	0 (Control)
12	1 x 10^6	0 (Control)

*Control: corresponden a células no infectadas

5.7.- Purificación de NTVP6

Posteriormente a la infección de 600 mL de células *Sf9* en medio PSFM con las condiciones seleccionadas en la optimización, se realizó el proceso de purificación de los NTVP6 por cromatografía de intercambio iónico y de exclusión molecular, siguiendo el protocolo de Plascencia-Villa et al. (2011) y el redactado en la tesis de Liñan Torres (2019). Ambas cromatografías se llevaron a cabo en un sistema FPLC ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare, Waukesha, EUA) acoplado a un sistema de adquisición de datos PrimeView (GE Healtcare), con la cual se monitorea la absorbancia (280 nm), conductividad y el pH.

El procedimiento inició con una centrifugación del cultivo celular a las 72 hpi a 4000 g por 10 min a 8 °C, del cual se obtuvo el sobrenadante clarificado, el cual se sometió a cromatografía de intercambio aniónico (CIA). Para este paso se utilizó una columna XK-16 (GE Healtcare), empacada con aproximadamente 40 mL de resina Q-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare), a un flujo de 5.5 mL/min. La columna se equilibró con el buffer A (30 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, a un pH 6.16). Tras la inyección de la muestra, se colectó el primer pico de la cromatografía (flow-through), en el que se esperaba encontrar la proteína VP6, ya que el pH de la solución coincide con su punto isoeléctrico (6.16). Bajo estas condiciones, los ácidos nucleicos y la proteína GP64 del baculovirus permanecen cargados negativamente y se unen a la resina. Los componentes retenidos se eluyeron con buffer B (30 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 6.16).

La fracción colectada (pico 1) se concentró utilizando una unidad de filtración de flujo tangencial (TFF, por sus siglas en inglés) utilizando un casete vivaflow200 (SARTORIUS, VF20P0) con un corte de 10 kDa, reduciendo el volumen a un máximo de 30 mL.

Posteriormente, el concentrado fue inyectado en una columna para cromatografía de exclusión molecular (CEM), en una columna XK-26 (GE Healthcare) empacada con 400 mL de resina ToyoPearl HW65F (TOSOH Biosciences, San Francisco, EUA), compuesta por partículas de 45 µm y poros de 100 nm, adecuada para

separar moléculas de 40 a 50 kDa. El flujo se mantuvo por debajo de 6 mL/min. La columna se equilibró con buffer C (30 mM Tris base, 0.1 mM EDTA, pH 8). Se colectaron todos los picos de la columna, previéndose que los NTVP6 se encuentren en el pico 1, ya que los nanotubos de VP6 tienen una dimensión mayor al poro por lo cual no entran a estos y son los primeros que eluyen, por lo que los demás picos tendrán partículas de menor tamaño, como VP6 en trímeros o monómeros. Las muestras obtenidas fueron almacenadas a 4 °C.

Finalmente el pico 1 obtenido por CEM se concentró mediante centricones con corte de 30 kDa (Corning, cat. 431490). La fracción final obtenida se almacenó a 4 °C, protegido de la luz, agregando azida de sodio (NaN_3) a una concentración final de 0.03% para evitar contaminación, manteniéndose estas condiciones hasta su uso.

En las condiciones optimizadas, en la que se realizó una infección con 2.5 UFP/cel a una concentración celular inicial de 2 x 10^6 cel/mL (sección de resultados 6.1.3), el sobrenadante clarificado fue separado en tres inyecciones para CIA, el pico 1, 3 y 5 (Figura 20) se combinaron y concentraron por TFF. El concentrado se inyectó a CEM y se colectó el pico 1, el cual fue concentrado por centricones de corte 30 kDa (Corning, 431484), posteriormente se concentraron por centrifugación al vacío “Savant SpeedVac” (ThermoFisher Scientific, EUA). y se les adicionó azida de sodio al 0.03%, estos fueron resguardados de la luz y se almacenaron a 4°C.

5.8.- Cuantificación de proteína

La concentración de proteína total en las fracciones purificadas se determinó mediante el kit de ensayo de BCA para proteínas de Pierce™ (Thermo Scientific, Cat. 23225).

Para la curva estándar, se prepararon diluciones de albúmina sérica bovina (BSA) en un intervalo de 5 a 1000 µg/mL, de los cuales se colocaron 25 µL de cada estándar por triplicado en una placa de 96 pozos. Además se adicionaron 25 µL de cada muestra por triplicado.

Posteriormente, se preparó el reactivo de trabajo BCA (WR) mezclando los reactivos A y B en proporción 50:1, del cual en cada pozo con muestra fueron adicionados 200 µL (WR). La placa se mezcló en un agitador orbital durante un minuto, posteriormente fue protegida de la luz y se incubó a 37 °C durante 2 h.

Posteriormente, se midió la absorbancia a 562 nm en el lector de microplacas FLUOstar Omega. A partir de los valores de absorbancia de los estándares se construyó la curva estándar de BSA (Figura 7), y a partir de esta curva se obtuvo la ecuación correspondiente a ella. Dicha ecuación fue utilizada para calcular la concentración de cada muestra sustituyendo su absorbancia en el eje Y.

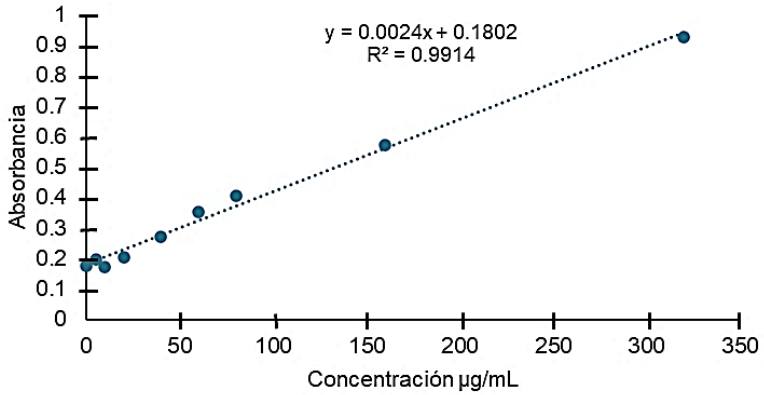


Figura 7. Ejemplo de curva estándar de BSA. Método por BCA para cuantificación de proteína en muestra.

5.9.- SDS-PAGE y Western blot

Las proteínas encontradas en las muestras obtenidas (ensayo de placa, purificación, bioconjugación, etc.) fueron analizadas utilizando geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), tinción con azul de Coomassie y WB. Las técnicas fueron empleadas para el análisis de sobrenadante de cultivo células, muestras purificadas, concentradas y bioconjugadas.

Las muestras para el análisis del sobrenadante, las muestras purificadas, y concentradas se mezclaron con buffer de carga desnaturalizante y reductor (glicerol 20%, SDS 5%, Tris-HCl 100 mM pH 6.8, β-mercaptoetanol 1%, azul de bromofenol 0.004%). En el caso de las muestras bioconjugadas se utilizó un buffer de carga

desnaturalizante (glicerol 20%, SDS 5%, Tris-HCl 100 mM pH 6.8, azul de bromofenol 0.004%). Estas mezclas fueron incubadas durante 15 minutos a 99 °C.

Para el SDS-PAGE las muestras se cargaron en geles de acrilamida al 10%, 12%, 15%, dependiendo el caso (especificado en resultados) utilizando buffer de corrida Tris-glicina-SDS (Tris base 24.8 mM, glicina 0.192 mM, EDTA 2mM, SDS 0.1%, pH 8.8). Además en cada gel se adicionó el marcador peso molecular (MPM) Dual Color (BioRad) para facilitar la identificación de las bandas proteicas obtenidas. Los geles se tiñeron o se sometieron a electro transferencia para WB. La electro transferencia se efectuó utilizando membranas de PDVF (Millipore) previamente activadas con metanol, en un sistema semiseco Owl™ (ThermoFisher Scientific) empleando buffer de transferencia (glicina 38.63 mM, tris base 47.88 mM, SDS 0.037%, metanol 20%), utilizando un amperaje constante de 80 mA durante 40 min para cada gel. La membrana resultante se incubó durante toda la noche a 4 °C para su bloqueo con leche descremada al 5% en buffer TBS-T (NaCl 37.5 mM, Tris-base 19.8 mM, pH 7.5, Tween 20 al 0.05%).

Posterior al bloqueo se realizaron tres lavados de 10 min cada uno con buffer TBS-T, subsecuentemente las membranas se incubaron durante 1 h con anticuerpo primario en agitación orbital, al finalizar el tiempo se realizaron tres lavados de 10 min con TBS-T. A continuación se incubaron las membranas durante 1 h en presencia del anticuerpo secundario, y al término del proceso se realizaron tres lavados con TBS-T de 10 minutos cada uno. Para finalizar se reveló usando 700 µL de Immobilon® Forte (Millipore), y se capturaron las imágenes tanto de los geles como de las membranas utilizando el fotodocumentador ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), analizando las imágenes por medio del software Image Lab™ 6.0.1 de Bio-Rad.

Como anticuerpos primarios se emplearon tres; para la detección de la proteína VP6, se empleó un suero policlonal de conejo anti-rotavirus cepa NCDV (previamente comparado con la cepa SA11, anexo 10.3), producido en el bioterio del IBt-UNAM por la M.C. Ruth Pastor con un rotavirus amplificado con la Dra.

Vanessa López de la Facultad de Medicina de la UAEM, en una dilución 1:2500; para la detección de la proteína GP64 de baculovirus se empleó el anticuerpo monoclonal (AcM) AcV5 (Invitrogen, Ref. 14-6995-82) a una dilución 1:3000, y en el caso de la detección de los epítopos de SARS-CoV-2 se utilizó un suero de un paciente positivo para COVID (obtenido por nuestro grupo de investigación durante la pandemia por COVID-19) en una dilución 1:1,000. En el caso de los anticuerpos secundarios utilizados se usó el AcM anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano en una dilución 1:5,000 para el anticuerpo primario anti-NCDV; un AcM anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa usado en una dilución 1:5,000 para el anticuerpo anti-GP64; y un anticuerpo anti-IgG de humano conjugado a peroxidasa 1:5,000 para el suero humano. Los anticuerpos fueron diluidos utilizando TBS-T, y el suero policlonal para la detección de los epítopos de SARs-CoV-2 fue diluido en leche descremada al 5% en buffer TBS-T.

5.10.- Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Para esta técnica se utilizaron rejillas de cobre de malla 200 cubiertas con formar y carbón (Electron Microscopy Science, EUA). En estas rejillas se colocaron 10 µL de la muestra purificada de NTVP6 durante 1 minuto, se retiró el excedente con papel absorbente, posteriormente se agregaron 10 µL de acetato de uranilo al 1% para la tinción negativa de las muestras, esto fue incubado por 1 minuto, pasado el tiempo se retiró el excedente con papel absorbente, la rejilla preparada se colocó en un porta muestras y se dejó secar por lo menos 30 minutos. Estas rejillas se llevaron a la Unidad de Microscopía Electrónica del IBt-UNAM en donde se observaron en un microscopio electrónico Zeiss LIBRA 120 (Zeiss, Alemania), operado a 80 kV.

5.11.- Dispersión dinámica de luz (DLS)

Para tener una caracterización del tamaño de las partículas presentes en la muestra purificada de la producción de VP6, se realizó un análisis mediante DLS. Esta técnica mide el radio hidrodinámico (Rh) de las partículas en solución a partir de las fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada, generadas por el movimiento browniano de las moléculas en el solvente y las correlaciona con el coeficiente de

difusión. Posteriormente, calcula el Rh utilizando la ecuación de Stokes-Einstein(R. F. Hallett, 1999; A. V. Malm & Corbett, 2019; Stetefeld et al., 2016).

Para este método se colocaron 40µL de muestra purificada de VP6 en una celda ZEN0040 (Malvern Panalytical), procurando que el volumen cubriera de manera uniforme el fondo de la celda y evitando la formación de burbujas. La celda fue colocada en el equipo Zetasizer.01 (Malvern), y se realizó la medición utilizando el software de ZETASIZER. Se realizaron tres mediciones a 633 nm y a 25°C.

Al finalizar las mediciones, el equipo genera los gráficos correspondientes a la distribución de tamaño de partícula, de los cuales se obtiene el Rh promedio, y se permite evaluar si la población de partículas es mono dispersa, en otras palabras que todas las partículas tienen un tamaño muy similar debido a la apreciación de un solo pico en la gráfica, o multimodal, lo que implicaría que la muestra contiene dos o más poblaciones de tamaños distintos, apreciado por dos o más picos en la distribución(R. F. Hallett, 1999; Stetefeld et al., 2016; Waters, 2025).

5.12.- Bioconjugación

5.12.1.- Selección de péptidos

Los péptidos empleados en el proceso de bioconjugación corresponden a epítopos T derivados de la proteína S de SARS-CoV-2, seleccionados por su papel en la activación de la respuesta inmunitaria mediada por células T, así como su conservación en la diversas variantes de la proteína S. Estos fueron seleccionados por el M. en C. Arturo Liñan Torres durante su proyecto de doctorado (Tabla 3). El peso molecular de cada péptido se determinó utilizando el software expasy (web.expasy.org/peptide_mass/).

Tabla 3. Péptidos seleccionados para bioconjugación**.**

Nombre de péptido	Proteína de origen	Longitud	Secuencia	*Peso (Da)
S1	Spike	9 aa	MIAQYTSAL	997.17
S2	Spike	15 aa	TSNFRVQPTESIVRF	1781

*Peso teórico calculado con software Expasy (Instituto Suizo de Bioinformática).

5.12.2.- Agente de entrecruzamiento

El linker AMAS (Thermofisher, Cat. 22295) fue seleccionado para realizar la bioconjugación entre los péptidos y NTVP6. El linker cuenta con extremos que reaccionan con grupos funcionales específicos. Por un lado, tiene un éster N-hidroxisulfoccinimida (NHS) que reacciona con aminas primarias, mientras que en el extremo opuesto tiene un grupo maleimida que puede formar un enlace con el grupo tiol. Se espera que el grupo maleimida forme un enlace con el sulfhidrilo de la cisteína 197 de VP6 (Figura 8). La bioconjugación fue realizada con el procedimiento de 2 pasos marcado en la ficha técnica del reactivo AMAS (sección 5.12.3).

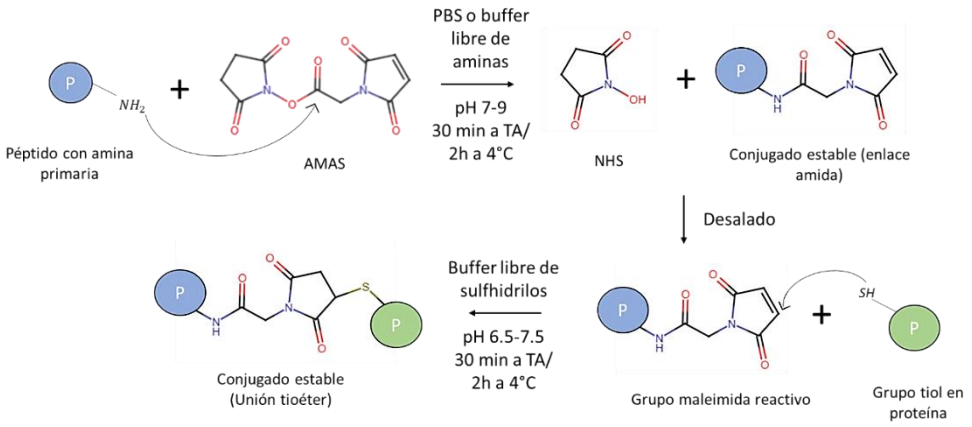


Figura 8. Mecanismo de reacciones sugerido para reactivo AMAS. Proceso de dos pasos utilizando el crosslinker AMAS durante la bioconjugación (Generado en PDB Chemical Sketch Tool).

5.12.3.- Condiciones para bioconjugación

La bioconjugación se realizó con el linker AMAS (sección 5.8.2) para asociar los péptidos derivados de SARS-CoV-2 (sección 5.8.1) a las cisteína197 de los NTVP6, en una relación 1:1, determinado con los cálculos descritos en la sección 5.12.4.

Primero, se preparó un stock de AMAS disolviendo 2.52 mg del linker en 1 mL de DMSO, obteniéndose una solución con una concentración final de 10 mM Posteriormente, se llevó a cabo el primer paso de las reacciones de conjugación en un volumen final de 2 mL, empleanod D-PBS (sección 6.2.1) o DMSO (sección 6.2.2) como medios de reacción.

En una prueba de condiciones (sección 6.2.1) se varió la concentración de péptido S2 según la columna [P] de la Tabla 4. Para la prueba de la sección 6.2.2 se emplearon 0.19 mg del péptido S1 o 0.36 mg del péptido S2, cantidades correspondientes a una concentración final de 0.1 mM en el volumen total de reacción. A cada mezcla se añadieron 200 μL del stock de AMAS 10 mM, alcanzando así una concentración final de 1 mM de AMAS en los 2 mL de volumen de reacción y manteniendo una proporción molar de 1:10 (péptido : linker). El conjugado péptido-AMAS (PA) se incubó según las condiciones de temperatura y tiempo indicadas en la tabla 4.

En ambas pruebas el conjugado PA obtenido se purificó mediante desalado con columnas ZipTip C18 (Millipore, cat. ZTC18s096) proporcionadas por el Laboratorio de Proteómica (IBt-UNAM), en este procedimiento se realizaron los siguientes pasos: la columna fue activada con 10 μL de ACN con 0.1% TFA, se desechó el líquido y se repitió 5 veces, posteriormente se tomaron 10 μL H_2O MQ con 0.1% TFA desechando el eluido y repitiendo también 5 veces; después, se aplicó la muestra y se descartó el eluido en el mismo tubo. Este paso se repitió hasta procesar toda la muestra o hasta saturar la columna. Para la elución, se tomó H_2O con 0.1% TFA hasta que se cubrió la resina y se recuperó en un tubo nuevo; luego se repitió el proceso utilizando ACN con 0.1% de TFA. Estos últimos 2 pasos se

realizaron tres veces. El procedimiento completo se llevó a cabo dos veces, obteniendo un tubo con el conjugado péptido-linker (PA). La fracción purificada se secó al vacío en un equipo Savant. Una vez seca, se le adicionaron NTVP6 (recuperados en 30 mM Tris base, 0.1 mM EDTA, pH 8.0).

En un ensayo preliminar para la bioconjugación se emplearon NTVP6 obtenidos en 2018. Se adicionaron NTVP6 de acuerdo con las condiciones A o B (Tabla 4) y las mezclas se incubaron toda la noche a 4 °C. El bioconjugado Péptido-AMAS-NTPV6 (PAN) fue evaluado mediante WB, analizando la presencia de la proteína VP6. Posteriormente se realizó un ensayo utilizando 200 ng de diferentes muestras de NTVP6; un stock de NTVP6 (anexo 10.6), NTVP6 obtenidos de una primera (Sección 6.1.2), tercera (Anexo 10.9) o una cuarta (sección 6.1.4) producción. La mezcla se incubó toda la noche a 4 °C. Los conjugados resultantes fueron evaluados mediante WB son anticuerpos dirigidos contra la proteína VP6 y contra la proteína S de SARS-CoV-2.

Tabla 4. Condiciones utilizadas para evaluar la bioconjugación.

Condición	***[P] (mM)**	****T (°C)**	**Tiempo**	µg *****PA**	**ng NTVP6**
A1	0.1	24	30 min	0.0078	200
A2	0.01	24	30 min	0.0078	200
A3	0.1	4	4 h	0.0078	200
A4	0.01	4	4 h	0.0078	200
B1	0.1	24	30 min	0.08	2500
B2	0.01	24	30 min	0.08	2500
B3	0.1	4	4h	0.08	2500
B4	0.01	4	4h	0.08	2500

Donde *[P] es la concentración de conjugado péptido-AMAS, **T es la temperatura de reacción, ***PA se refiere a la unión Péptido-AMAS.

5.12.4.- Ecuaciones para determinar la relación NTVP6-péptidos

Para realizar la conjugación en las proporciones recomendadas se proponen los cálculos de las ecuaciones 9 a 16 donde se obtuvo un estimado de la cantidad de cisteínas 197 (C197) en un microgramo de NTVP6, considerando diferentes parámetros estructurales y moleculares, como el ancho de los NTVP6 en medios con un pH mayor a 7 (45 nm), por el buffer en el que se encuentran al final de la purificación como indica la sección 5.7 (75 nm), el largo promedio estimado a partir de lo reportado en la producción de NTVP6 (1300 nm) (Plascencia-Villa et al., 2009, 2011; Rodríguez et al., 2014; Rodríguez-Galván et al., 2008; Tamminen et al., 2020), el diámetro del trímero de VP6 (4.5 nm) y el peso molecular aproximado del monómero de VP6 (45 KDa), información obtenida de Mathieu et al., (2001) y Rodríguez-Galván et al., (2008).

Ecuación 9. Cálculo de área superficial de los NTVP6 (A_{NT}).

$$A_{NT} = 2\pi * r * h = 2\pi(22.5\ \text{nm})(1300\ \text{nm}) = 183783.17 \frac{nm^2}{NTVP6}$$

Ecuación 10. Área superficial de trímero de VP6 (A_{tr})

$$A_{tr} = \pi r^2 = \pi(2.25)^2 = 15.9\ \text{nm}^2 = \frac{nm^2}{trim}$$

Ecuación 11. Trímeros obtenidos por NTVP6 (N_{tr})

$$N_{tr} = \frac{A_{NT}}{A_{Trim}} = \frac{183783.17\ nm^2/NTVP6}{15.9\ nm^2/trim} = 11558.69 \frac{trim}{NTVP6}$$

Ecuación 12. Monómeros estimados por NTVP6 (N_{mon})

$$N_{mon} = N_{tr} * 3\frac{mon}{trim} = \left(11558.69\frac{trim}{NTVP6}\right) * \left(3\frac{mon}{trim}\right) = 34676\frac{mon}{NTVP6}$$

Ecuación 13. Masa molecular de un monómero de VP6 (m_{mon})

$$m_{mon} = \frac{PM_{mon}}{NA} = \frac{45\ 000\ g/mol}{6.022\ x\ 10^{23}\ particulas\ de\ mon/mol} = 7.47\ x\ 10^{-20}\frac{g}{mon}$$

Ecuación 14. Masa total por NTVP6 (m_{NT})

$$m_{NT} = N_{mon} * m_{mon} = 34676 \frac{mon}{NTVP6} * 7.47\ x\ 10^{-20} \frac{g}{mon} = 2.59\ x\ 10^{-15} \frac{g}{NTVP6}$$

Ecuación 15. Cantidad de NTVP6 / µg (N_{NT})

$$N_{NT} = \frac{1\ \mu g}{m_{NT}} = \frac{1\ x\ 10^{-6}\ g}{2.59\ x\ 10^{-15}\ g/NTVP6} = 390.625\ x\ 10^{6}\ NTVP6$$

Ecuación 16. Número de C197 / µg de NTVP6

$$N_{CNT} = N_{NT} * N_{C197} = \ 390.625\ x\ 10^{6}\ NTVP6 * 34676 \frac{C197}{NTVP6} = 1.35x10^{13}\ C197$$

A partir de estos cálculos se estimó la cantidad de péptido requerida para conjugar con 1 µg de NTVP6, teniendo en cuenta que la relación mínima para la bioconjugación fue 1:1 (C197 : péptido), por lo tanto, se necesitarían $1.35 \text{ x } 10^{13}$ péptidos / µg de NTVP6. Con este dato se propusieron las ecuaciones 17 y 18 para establecer una relación para la bioconjugación que permitió calcular los µg de péptido necesarios por 1 µg de NTVP6, la cual se desarrolló considerando el péptido S2 (1781 Da, tabla 3).

Ecuación 17. Moles necesarios de péptidos para la bioconjugación

$$n_{pep} = \frac{N_{C197}}{NA} = \frac{1.35\ x\ 10^{13} pep}{6.022\ x\ 10^{23} partículas\ de\ pep/mol} = 2.24\ x\ 10^{-11} mol$$

Ecuación 18. Masa de péptido S2 necesarios por µg de NTVP6

$$m_{pep} = n_{pep} * M_{pep} = \ 2.24\ x\ 10^{-11} mol * 1781 \frac{g}{mol} = 3.99 \text{ x } 10^{-8} \text{g}$$

Este resultado indicó que por cada microgramo de NTVP6 se requirieron como mínimo 0.0399 µg de péptido S2. Las mismas ecuaciones fueron realizadas para el péptido S1 (Da) del cual se calculó el uso aproximado de 0.024 µg por 1 µg de NTVP6.

5.13.- Clonación de plásmidos y transformación bacteriana

5.13.1 Amplificación del gen VP6

A partir de los plásmidos pJET1.2-RBS_VP6 (Figura 9) y pSB1T3-VP6 (anexo 10.2), donados por el Lic. Enrique Paz del laboratorio de Ingeniería de Bioprocesos y Nanobiotecnología del IBt, UNAM, se amplificó la secuencia del gen VP6 de rotavirus de la cepa SA11, y utilizando los oligonucleótidos FwVP6 y RvVP6 (Tabla 5) se mandó a la unidad de síntesis y secuenciación, comparando la secuencia obtenida con la secuencia de VP6 cepa SA11, corroborando así la presencia del gen VP6 y la igualdad de esta con el gel plásmido pJET1.2-RBS_VP6 (Figura 28).

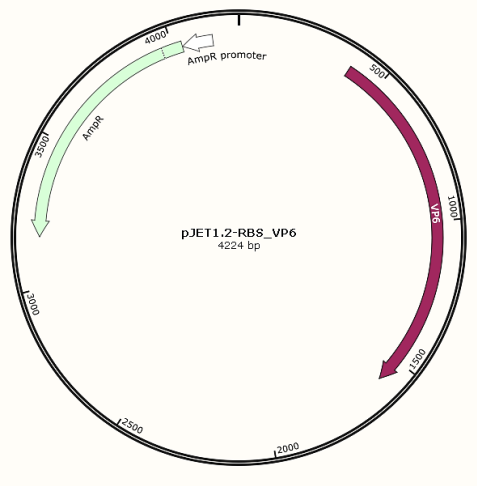


Figura 9. pJET1.2-RBS_VP6. En violeta, gen VP6 de la cepa SA11.

Tabla 5. Oligonucleotidos utilizados para clonación, amplificación y secuenciación.

Oligonucleótido	Secuencia 5´→3´	Función
Fw_VP6	CCGCGAATTCGCCACCATGGATGTCCTATAC	Amplificación
Rv_VP6	CCGCAAGCTTTCATTTAATGAGCA	gen VP6
Fw_pJET	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	Secuenciación y
Rv_pJET	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	amplificación de
		pJET1.2

5.13.2.- Obtención del fragmento G15

Se diseñó el fragmento G15 (Tabla 6) que codifica para el péptido de 15 aa (S2) de la proteína S de SARS-CoV-2. Este fragmento se mandó a sintetizar (gBlocks® Gene Fragments, IDT). El fragmento codifica desde el codón de inicio de VP6 (subrayado) hasta el residuo 171, seguido del linker GPG (azul), la secuencia del péptido S2 (rojo), seguido de otro linker GPG(azul) y una región adicional del gen VP6 que contiene el sitio de corte para la enzima BstAPI.

Para su uso los 500 ng de fragmento G15 fueron diluido en 25 µL de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), esto fue mezclado por vórtex. Posteriormente se incubó 20 min a 50 °C, se volvió a mezclar por vórtex, se centrifugó a 3000g durante 2 min, y fue almacenado a -20 °C.

Tabla 6. Fragmento sintetizado para la inserción de péptido de SARS-CoV-2.

Fragmento G15	Secuencia
VP6GPG15aaGPGVP6	Cgatcggaattcgccaccatggatgtcctatactctttgtcaaagactcttaaagacgctagagacaaaatt gtcgaaggcacattgtattctaacgtgagtgatctgatccagcaattcaaccagatgataattactatgaatg gaaatgaatttcaaactggaggaatcggtaatttgccaattagaaactggaattttaatttcgggttacttgga acaactttgctgaacttagacgctaattatgttgaaacggcaagaaatacaattgattatttcgtggattttgta gacaatgtatgcatggatgagatggttagagaatcacaaaggaacggaattgcacctcaatcagactcgc taagaaagctgtcagccatcaagttcaagagaataaattttgataattcgtcggaatacatagaaaactgg aatttgcaaaatagaagacagaggacaggtttcacttttcataaaccaaacatttttccttattcagcatcattt acactaaatagatcacaaccgGGGCCCGGTACTTCTAACTTTAGAGTCCAACCAA CAGAATCTATTGTTAGATTTGGTCCCGGGgctcatgataatttgatgggcacaatgtggtt aaacgcaggatcggaaattcaagtcgctggatttgactactcatgtgctattaacgcaccagccaatataca acaatttgagcatattgtgc

5.13.3.- Plásmido pJET1.2_G15

El fragmento G15 se insertó en el plásmido pJET1.2 utilizando el kit Clone JET PCR Cloning (Thermo Scientific, Cat. K1231) para obtener el plásmido pJET1.2_G15 (Figura 10). En este caso se utilizaron 10 µL de buffer de reacción 2x, 1 µL del stock de fragmento G15, 1 µL del vector de clonación pJET1.2, 1 µL de T4 DNA ligasa, y

se llevó a un volumen final de 20 µL con agua libre de nucleasas. Esta reacción se mezcló por pipeteo y se dejó incubando por 12 h a 4 °C.

Posteriormente la ligación fue utilizada para realizar una transformación bacteriana, sección 5.13.4.

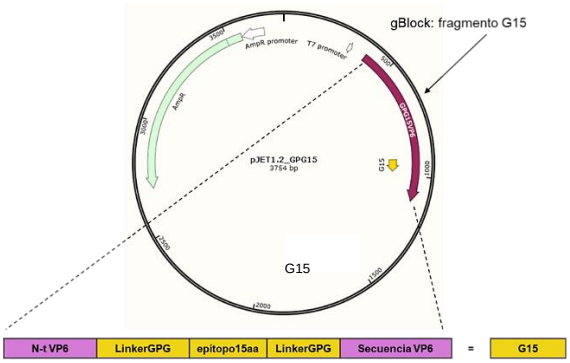


Figura 10. pJET1.2_G15. Se muestra el sitio de inserción del fragmento G15 en pJET1.2. En morado, regiones que codifican para VP6, y en amarillo, la secuencia del linker y del epítopo S2. N-t VP6: región N-terminal de VP6.

5.13.4.- Metodología general para transformación bacteriana

Para la clonación de plásmidos y transformación de bacterias químicamente competentes *E. coli* One Shot™ TOP10 (ThermoFisher Scientific), se realizó la digestión de los plásmidos o fragmentos de ADN utilizando las enzimas correspondientes (Tabla 7), la digestión se realizó con 500 ng del plásmido, 1 µL de la enzima de digestión, buffer correspondiente de la enzima en agua libre de nucleasas, se dejó a 37 °C (60 °C para *Bst API*) durante 2 h. Posteriormente, estos productos fueron purificados mediante columnas, utilizando el kit DNA Cleaning (ZYMO research).

En caso de que las digestiones se utilizaran para una posterior ligación, las digestiones purificadas se mezclaron en proporciones molares 5:1 o 7:1 (inserto : vector), calculadas con NEBiocalculator (https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation). Una vez calculada la cantidad necesaria de inserto y vector, se agregó T4 DNA ligasa, buffer de ligación, en agua libre de nucleasas, la ligación se incubó durante 2 h a TA.

La mezcla de ligación se utilizó para transformar *E. coli* TOP10 mediante choque térmico (30 minutos en hielo, 45 segundos a 42 °C y 3 minutos en hielo). Se añadieron 500 µL de medio de recuperación (900 µL de LB, 20 µL de $MgCl_2$ 1 M y 20 µL de glucosa 1 M), y se incubó a 37 °C durante 1 h a 250 rpm.

Las bacterias se sembraron en placas con agar LB (2 g de triptona, 1 g de extracto de levadura, 2 g de NaCl y 3 g de agar en 200 mL de agua Mili Q, pH 7), suplementado con 100 µg/mL de ampicilina . Las placas se incubaron a 37 °C en un ambiente húmedo sellado durante 12–14 h.

Posteriormente, se seleccionaron colonias aisladas y se realizó PCR de colonia para confirmar la presencia del fragmento clonado. Las colonias positivas se propagaron en medio LB líquido (2 g de triptona, 1 g de extracto de levadura y 2 g de NaCl en 200 mL de agua Mili Q) suplementado con 100 µg/mL de ampicilina, incubadas a 37 °C y 250 rpm durante 12–14 h.

A partir de los cultivos se purificaron plásmidos utilizando el kit de extracción (Jena Biosciences, Cat. PP-204L). Los plásmidos obtenidos fueron amplificados por PCR de colonia, se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL; se emplearon 0.5 µL de oligonucleótidos (10 µM), 0.125 µL de la enzima Taq polimerasa, 2.5 µL del buffer de la enzima Taq polimerasa, la colonia que se deseaba comprobar y 0.5 µL de dNTPs (10 mM). Las condiciones de la PCR fueron 5 min a 95 °C, 35 ciclos de 15 s a 95 °C, 15 s a 60 °C, 54 s a 68 °C y para la extensión final 5 min a 68 °C. Los productos obtenidos se analizaron en gel de agarosa 1.2%.

Las colonias positivas se analizaron mediante digestión enzimática específica para cada construcción (tabla 7), manteniendo la reacción 2 h a 37 °C, las digestiones se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% o 2% dependiendo del tamaño del fragmento utilizando como marcadores de peso molecular Plus DNA Ladder (Maestrogen) 1Kb o 100 pb de acuerdo a las bandas esperadas. En los casos positivos, se enviaron a secuenciación y se compararon con la secuencia esperada.

Tabla 7. Enzimas utilizadas para ingeniería genética.

Enzimas	Vector	Sitio de corte	Tamaño de banda esperado (pb)
Pst I	pJET1.2-RBS_VP6	2	2856 1368
Mlu I	pSB1T3_VP6	2	2195 pb
Bam HI			1458 pb
Apa I	Digestión pJET1.2-G15	2	2837
Pst I			917
Bst API	VP6	1	714 656
Bst API	pJET1.2_VP6-G15	2	3563
Xho I			750

5.13.5.- Ligación in vitro de G15 y VP6

Se amplificó G15 a partir de pJET1.2_G15 y VP6 a partir de pJET1.2_RBS-VP6 por PCR, en un volumen final de 50 µL; se emplearon 2.5 µL de oligonucleótidos de pJET (10 µM), 0.5 µL de la enzima Phusion, 10 µL del buffer de la enzima Phusion, 1 µL de dNTPs (10 mM) y se probaron dos condiciones de templado, la primera con 0.5 ng y la segunda con 1 ng. las condiciones de la PCR fueron 30 s a 98 °C, 35 ciclos de 6 s a 98 °C, 15 s a 60 °C, 22 s a 72 °C y para la extensión final 5 min a 72 °C. Los productos obtenidos se analizaron en gel de agarosa 0.8%. Posteriormente se digirieron las amplificaciones de G15 y VP6 con la enzima Bst API, la cual genera extremos cohesivos en ambos. Los productos digeridos se purificaron a partir de un gel de agarosa al 0.8% mediante extracción de banda utilizando el kit de extracción de DNA (Monarch®, New England Biolabs), para lo cual a la banda recuperada se

adicionó 3 veces de volumen en mL lo que pesara en mg del buffer de extracción, esta mezcla se incubó a 45 °C por 5 min, el líquido obtenido se agregó a las columnas correspondientes, se centrifugó a 10000 g por 30 s, y se eluyó con 5 µL de agua sin nucleasas, con lo que centrifugó a 10000 g por 30 s.

Los fragmentos purificados se ligaron utilizando la enzima T4 DNA ligasa (ThermoFisher Scientific) durante 1 h a 37 °C. Posteriormente se guardó a 4 °C (A), o se purificaron por columna (B), antes de realizar PCR para amplificar el producto VP6-G15. El producto de la ligación se amplificó por PCR , en un volumen final de 50 µL utilizando la enzima Phusion como se describió previamente y utilizando 3 diversas cantidades de templado (0.1, 2 y 5 µL), las condiciones de la PCR fueron 30 s a 98 °C, 35 ciclos de 5 s a 98 °C, 20 s a 60 °C, 22 s a 72 °C y para la extensión final 5 min a 72 °C. Los productos obtenidos se analizaron en gel de agarosa 0.8%. Este proceso se realizó para obtener el gen completo de VP6 con la inserción de la secuencia del péptido S2 entre los codones correspondientes a los aa 171 y 172, fragmento denominado VP6-G15. Por este método se obtuvo un producto positivo de 1284 pb.

El amplicón del fragmento VP6-G15 fue clonado en pJET1.2 como se ha descrito en la sección 5.13.3 añadiendo 5 µL de la ligación positiva, y se usó para transformar bacteria quimio competentes (como se describe en la sección 5.13.4). Las colonias positivas seleccionadas por antibiótico se llevaron a realizar PCR de colonia utilizando la enzima Taq polimerasa. Las condiciones de la PCR fueron 30 s a 95 °C, 35 ciclos de 15 s a 95 °C, 20 s a 60 °C, 2 min a 68 °C y para la extensión final 5 min a 68 °C. Los productos obtenidos se analizaron en gel de agarosa 1.2%.

Esto se realizó para construir el vector pJET1.2_VP6-G15 (Figura 11). Posteriormente el vector se introduciría a un vector pFastBac1 para continuar con el sistema SCI-BV.

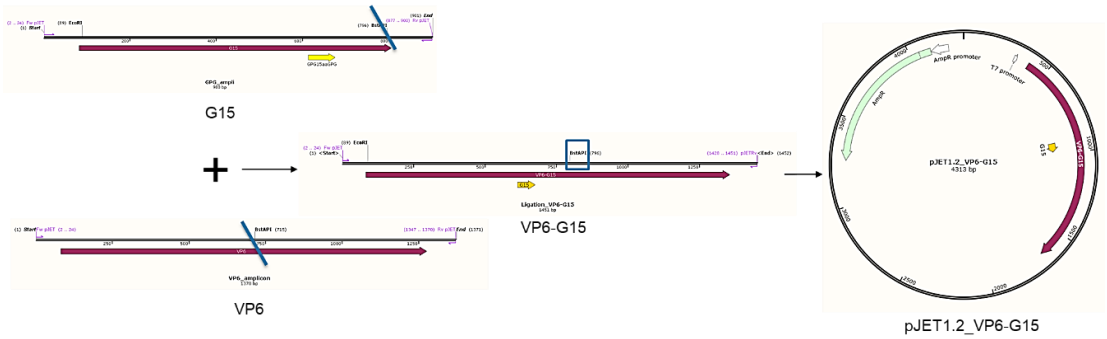


Figura 11. Construcción de vector pJET1.2_VP6-G15 por metodología B. En azul se resalta el sitio de corte para la enzima BstAPI.

6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1.- Producción de NTVP6

6.1.1.- Producción de *stock* bacVP6

A partir de un stock de bacVP6, se aisló baculovirus productor de VP6 mediante un ensayo de placa. Posteriormente se evaluó mediante WB la presencia de VP6 a partir de los sobrenadantes de las placas seleccionadas *(*Figura 12), a partir de lo cual se seleccionó una de las placas para la amplificación de bacVP6.

De las 6 placas seleccionadas, en 5 de ellas se observaron bandas correspondientes a la producción de VP6 (Figura 12). En algunos casos se observaron bandas de mayor peso molecular que también corresponden a VP6, las cuales por su tamaño y detección por WB podrían ser trímeros no desnaturalizados.

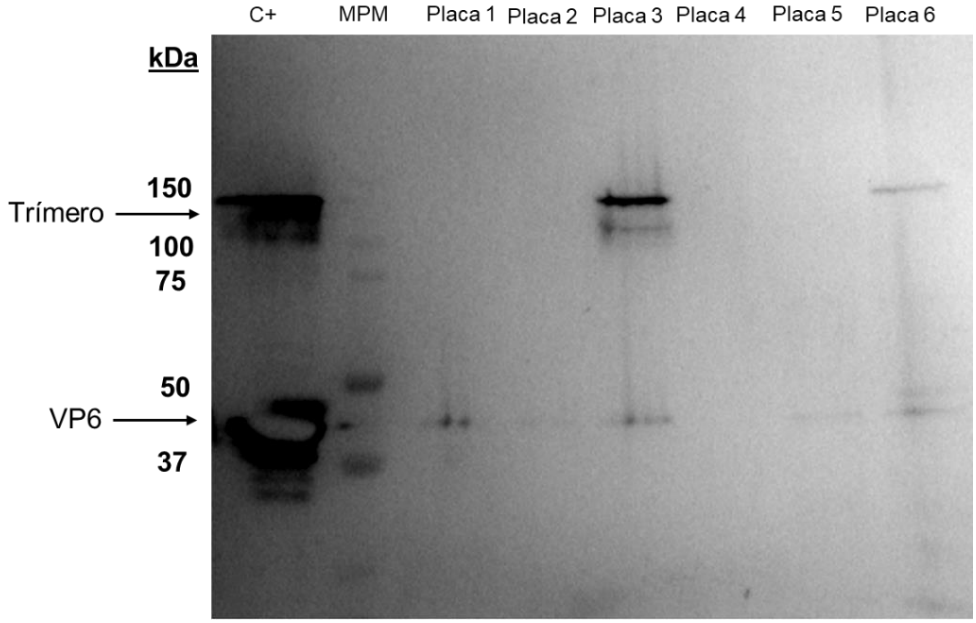


Figura 12. WB con anti-VP6 de las placas aisladas de bacVP6. Se analizaron seis placas seleccionadas del ensayo de placa. La banda esperada corresponde al monómero de VP6, de un peso aproximado de 45 KDa. El C+ pertenece al stock de NTVP6 (Anexo 10.6).

A partir de la placa 3 se generaron el pase 1, y posteriormente el pase 2, como se describe en materiales y métodos (Sección 5.5); cada uno de los pases obtenidos fue titulado por MTT. En la Figura 13 se graficaron los datos de absorbancia obtenidos por este procedimiento y el titulo viral se calculó como se describe en la sección 5.5. El título obtenido expresado como UFP/ml se muestra en la Tabla 8.

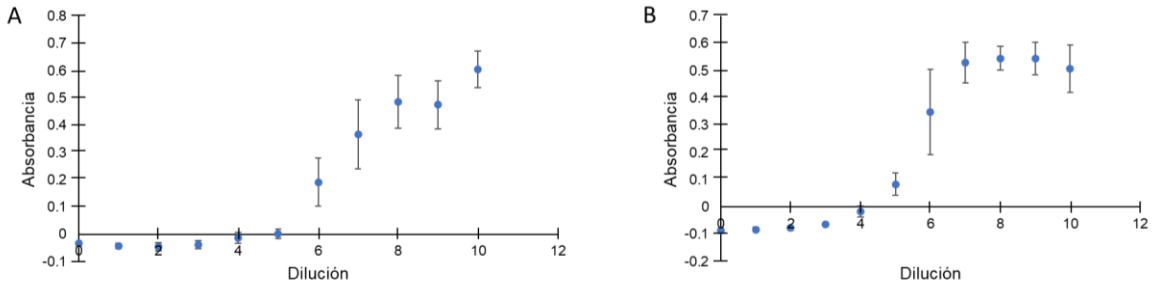


Figura 13. Curva de titulación viral de bacVP6. En los ejes se muestran valores del logaritmo negativo de las diluciones y absorbancia. A) Sigmoide de titulación de pase 1. B) Sigmoide de titulación de pase 2.

Tabla 8. Títulos virales de los pases 1 y 2 de bacVP6.

Baculovirus	Pase	Título (UFP/mL)
bacVP6	1	1.59×10^9
bacVP6	2	2.49×10^8

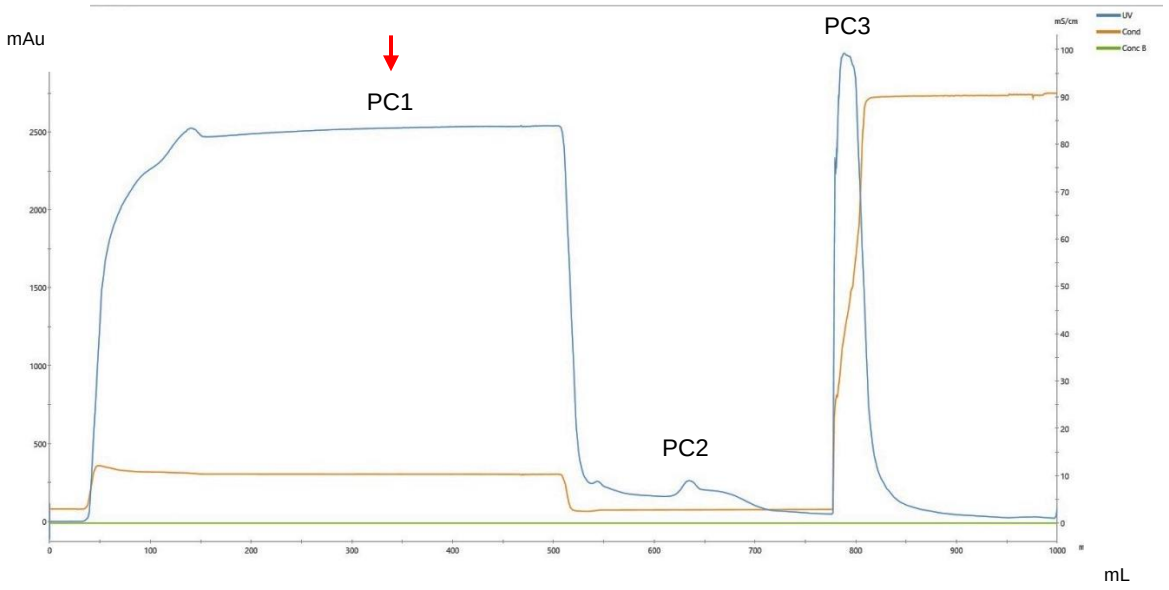
Los valores resultantes de ambos pases son mayores a 10^7 UFP/mL, lo cual es un título recomendable para los stocks virales (Palomares & Ramírez, 2009). El pase 2 fue utilizado como el pase de trabajo para realizar la producción de NTVP6.

6.1.2.- Producción de NTVP6

El stock de NTVP6 fue analizado (anexo 10.3) y se observó que no se encontraban en las condiciones óptimas para realizar el proceso de bioconjugación. Por lo tanto se produjeron NTVP6 a una TDI de 0.5 x 10^6 cel/mL, infectando 600 mL a una MDI de 0.5 UFP/cel (Tabla 9); el cultivo de células fue cosechado cuando la viabilidad alcanzó entre el 40-50% de viabilidad. Se colectó por centrifugación y se recuperó el sobrenadante clarificado, el cual fue almacenado a 4 °C protegido de la luz.

A partir del sobrenadante clarificado se realizó la purificación de VP6 por CIA, donde se colectó el pico 1 (PC1), el cual fue concentrado por TFF. Más adelante el concentrado se inyectó en la columna para realizar CEM y se colectaron todos los picos para analizar la presencia de VP6. De acuerdo a lo reportado por Plascencia-Villa et al. (2011), el PC1 contiene las estructuras más grandes, en este caso los NTVP6 (Figura 14), por esto el PC1 fue concentrado hasta llevarlo a 500 µL y a partir de este se realizaron los análisis pertinentes para confirmar la presencia de los NTVP6.

A)



B)

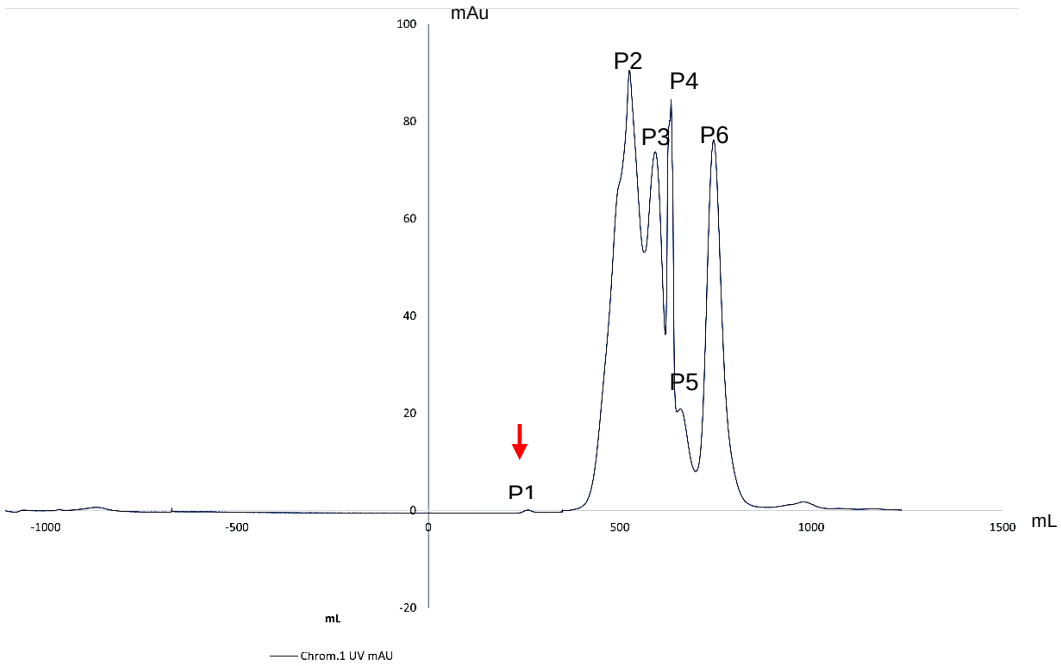


Figura 14. Cromatogramas de la purificación de NTVP6. A) cromatograma de CIA, B) cromatograma de CEM. PC; picos de CIA, P; picos colectados de CEM. En el eje Y se encuentra el valor de absorbancia en mAu, y el eje X corresponde a volumen, mL. En flecha roja se marcan los picos colectados para la obtención de NTVP6.

En comparación a lo reportado previamente (Plascencia-Villa et al., 2011), el perfil de CIA fue similar mientras que el perfil de CEM fue distinto. En el trabajo de Plascencia-Villa (2011) se obtuvieron 4 picos mientras que en el presente trabajo en esta primera producción se observaron 6 picos con una mayor absorbancia. Esto fue posiblemente causado por diversos factores, por ejemplo el uso de células de insecto y medio diferentes a Plascencia-Villa et al. (2011), el pase celular utilizado, el tiempo de cosecha o los materiales para la purificación como el tipo de columna o resina utilizados.

Las muestras obtenidas de todos los pasos de la purificación fueron analizadas por SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie (Figura 15A) y WB (Figura 15B). El pico 1 de CIA (PC1), donde se asumió que se encontraba la proteína VP6, se concentró por completo por TFF y el concentrado se agregó a CEM, el PC1 y su concentrado no se muestran en el gel.

En la figura 15A se analizó la presencia de proteínas en las muestras obtenidas. En el PC3 correspondiente a la depuración de la columna de CIA se observó un posible remanente de la proteína VP6 así como una banda que alerta sobre la presencia de la proteína GP64, proteína perteneciente a la envoltura de los baculovirus (Chambers et al., 2018) y contaminante para el proceso de purificación de VP6. También se observó una banda correspondiente a VP6 en el primer pico colectado por CEM (P1).

En el WB de la figura 15B se analizó la presencia de la proteína VP6 en las muestras de lo unido a CIA (PC2 y PC3), en el permeado de la concentración por TFF y en los picos de CEM. En el PC3 se confirmó la presencia de la proteína VP6, la cual fue de menor intensidad comparada con la banda de P1, pero implica perdida de la proteína en la muestra final. También se observaron bandas de mayor peso que podría corresponder a trímeros de VP6 que no fueron correctamente desnaturalizados.

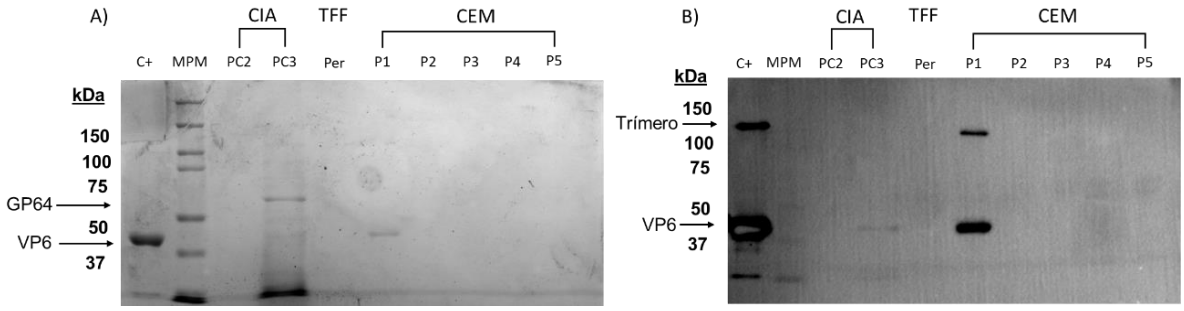


Figura 15. Caracterización de primera producción de NTVP6. A) SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie. B) WB contra VP6. C+; Control positivo NTVP6 producidos en 2018.

Para mejorar la recuperación y purificación de VP6 se analizó el volumen inyectado en CIA bajo las mismas condiciones, hasta que se observó la salida del contaminante GP64. Para ello se realizó la segunda purificación (Tabla 9) en la cual se observó que aproximadamente a los 400 mL inyectados comenzó a identificarse la banda de 64 kDa (anexos 10.4). Con base en este resultado, durante producciones posteriores de VP6 en un volumen de trabajo de 400 mL o mayor se fraccionó el volumen inyectado.

Tabla 9. Condiciones de producción de VP6 y resultados obtenidos.

Producción	TOI (cel/mL)	MOI (UFP/cel)	Vol. total (mL)	Muestra	Inyecciones	GP64	Esterilización	Rendimiento (mg/L)	Formación de NTVP6
PV1*	$0.5X10^6$	0.5	600	Sobrenadante clarificado	1	Si (abundante)	No	0.073	Si
PV2*	$0.5X10^6$	0.5	900	Sobrenadante clarificado filtrado 0.22 µm	1	Si (abundante)	NaNO3 0.03%	No analizado	No analizado

* PV, producción de VP6

Las muestras obtenidas se caracterizaron para comprobar la producción de la proteína VP6 y se realizó una cuantificación de proteína por BCA, analizando el P1 de CEM. Este procedimiento permitió calcular la concentración de proteína obtenida, el cual fue de 73.3 ng/µL, obteniendo un rendimiento de 0.073 mg/L. Este resultado fue más bajo que el reportado por Liñan (2019), quién empleo las mismas condiciones y el mismo medio, pero con una línea celular diferente (Hi5), con la cual obtuvo un rendimiento de 2.28 mg/L.

El pico 1 obtenido de CEM fue analizado por MET (Figura 16A y B), se logró visualizar la presencia de NTVP6. Estos presentaron el patrón cuasihexagonal característico de los NTVP6 como se observa en la figura 16B (Lepault, et al., 2001; Mathieu et al., 2001; Plascencia-Villa et al., 2009) y se observó la presencia de tubos de un tamaño aproximado de 75 nm de ancho, lo cual difiere con el tamaño esperado para las condiciones utilizadas, pues se esperaban NTVP6 de un ancho aproximado a 45 nm de acuerdo a lo reportado por Lepault et al. (2001). Sin embargo, concuerda con lo reportado en la tesis de Liñan Torres (2019), quien con las mismas condiciones de purificación pero diferente línea celular obtuvo NTVP6 de aproximadamente 76 nm de ancho.

A la misma muestra se le realizó un análisis por DLS (Figura 16C), del cual se obtuvo un Rh de 854.2 nm. La gráfica coincide con los resultados de Tamminen et al. (2020) para los NTVP6 y el tamaño concuerda con los NTVP6 de 2018 usados como C+. Esto demostró la capacidad de obtener NTVP6 a partir de células *Sf9* en medio PSFM, pues de acuerdo a lo reportado por Rivas (2013) algunas combinaciones de medio de cultivo y células de insecto no dan lugar a NTVP6.

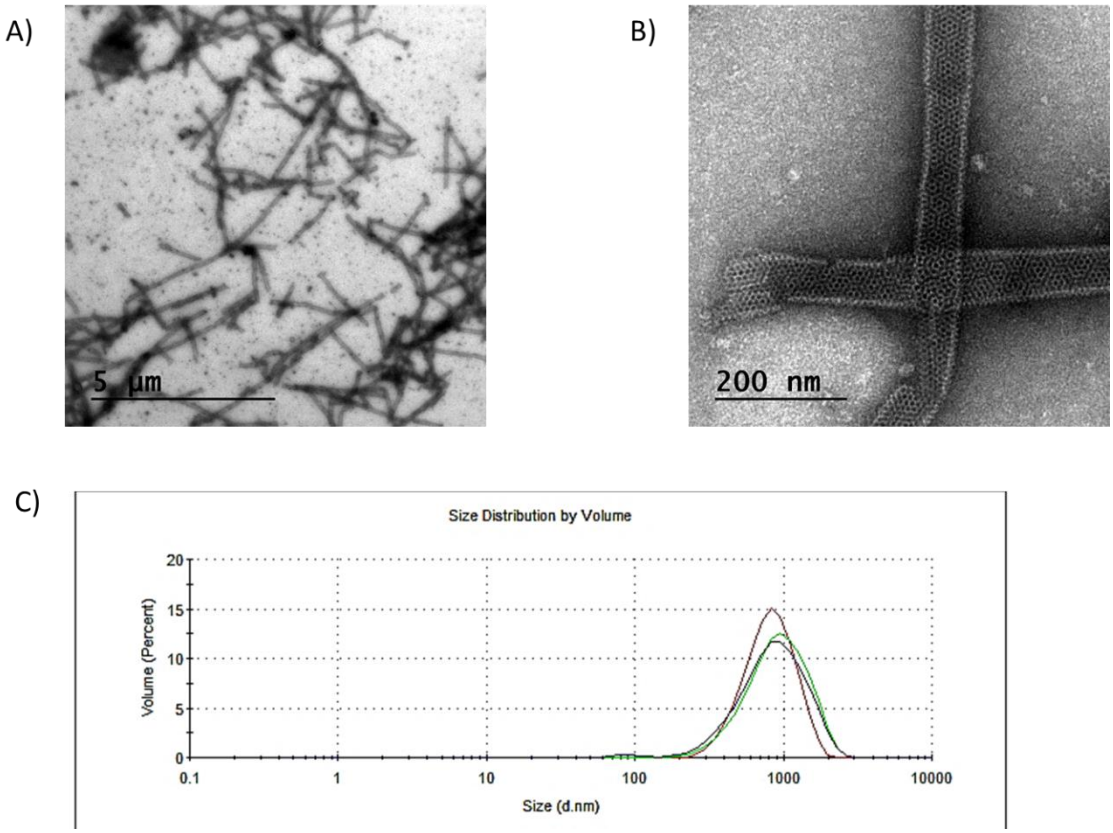


Figura 16. Caracterización de NTVP6 obtenidos por primera producción. A y B) Micrografía obtenidas por TEM, utilizando tinción negativa con acetato de uranilo 1X. A) TEM aumento a 2,000x y B) TEM aumento a 31,500x. C) DLS, medición por triplicado, Rh de 854.2 nm, con distribución monomodal.

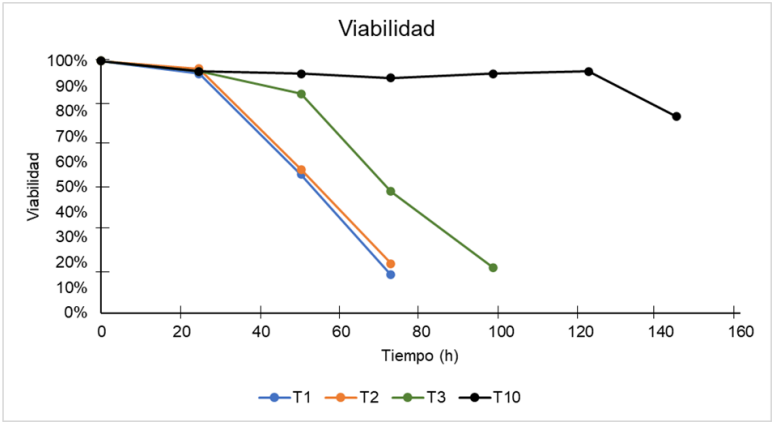
6.1.3.- Metodología inicial para optimización de producción de VP6

Debido al bajo rendimiento obtenido, ligado a una combinación de una línea celular y un medio de cultivo no reportados previamente para la producción de NTVP6, se buscaron las condiciones en que se produzca una mayor cantidad de VP6, para esto se realizaron diversas cinéticas celulares donde se variaban los valores de la concentración celular inicial al momento de la infección y la MDI al infectar las células *Sf9* con el pase 2 de bacVP6, como se indica en la sección 5.6.1.

Se tomaron muestras cada 24 h, a partir de las cuales se obtuvo la densidad celular y la viabilidad formando las gráficas de la figura 17. La cinética se detuvo cuando la viabilidad fue menor al 30%.

En la figura 17 se puede apreciar que los tratamientos con una MDI de 5 y 2.5 UFP/mL (líneas azul y naranja, respectivamente) son similares en comportamiento al bajar la viabilidad a menos del 30% a las 72 hpi, mientras que cuando se utilizó una MDI de 0.5 (líneas verdes) la viabilidad decayó más lento llegando a menos del 30% a las 96 hpi. Los controles decaen del 90% de viabilidad después de las 120 h lo cual concuerda con lo reportado por Rivas Pedraza (2013) para este medio de cultivo.

A



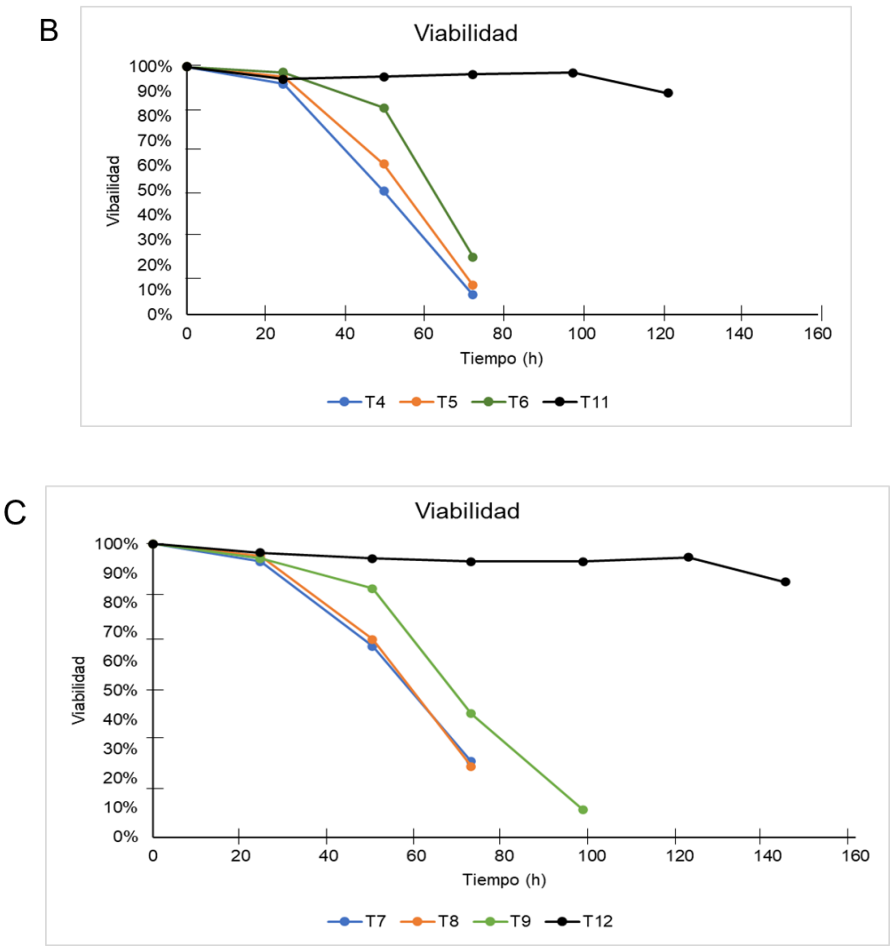


Figura 17. Gráficas de viabilidad correspondientes a tratamientos para optimización. Comparación de la viabilidad celular durante la cinética correspondiente a tratamientos de tabla 2. Las líneas de color azul corresponden a una MDI de 5 UFP/mL, las de color naranja representan la MDI de 2.5 UFP/mL, el color verde es correspondiente a 0.5 UFP/mL y el color negro representa el control (células sin infectar). A) TDI de 4 x 10^6, B) TDI de 2 x 10^6 y C) TDI de 1 x 10^6 .

En la figura 18, se graficó la variación de la concentración celular total (línea sólida) y de concentración celular viable (línea punteada) de cada tratamiento. Se observó que las células infectadas con menor MDI tenían un mayor crecimiento celular. Todas las condiciones llegaron a su punto máximo de densidad celular viable a las 24 h, y a partir de las 48 h se observó el decaimiento de la viabilidad.

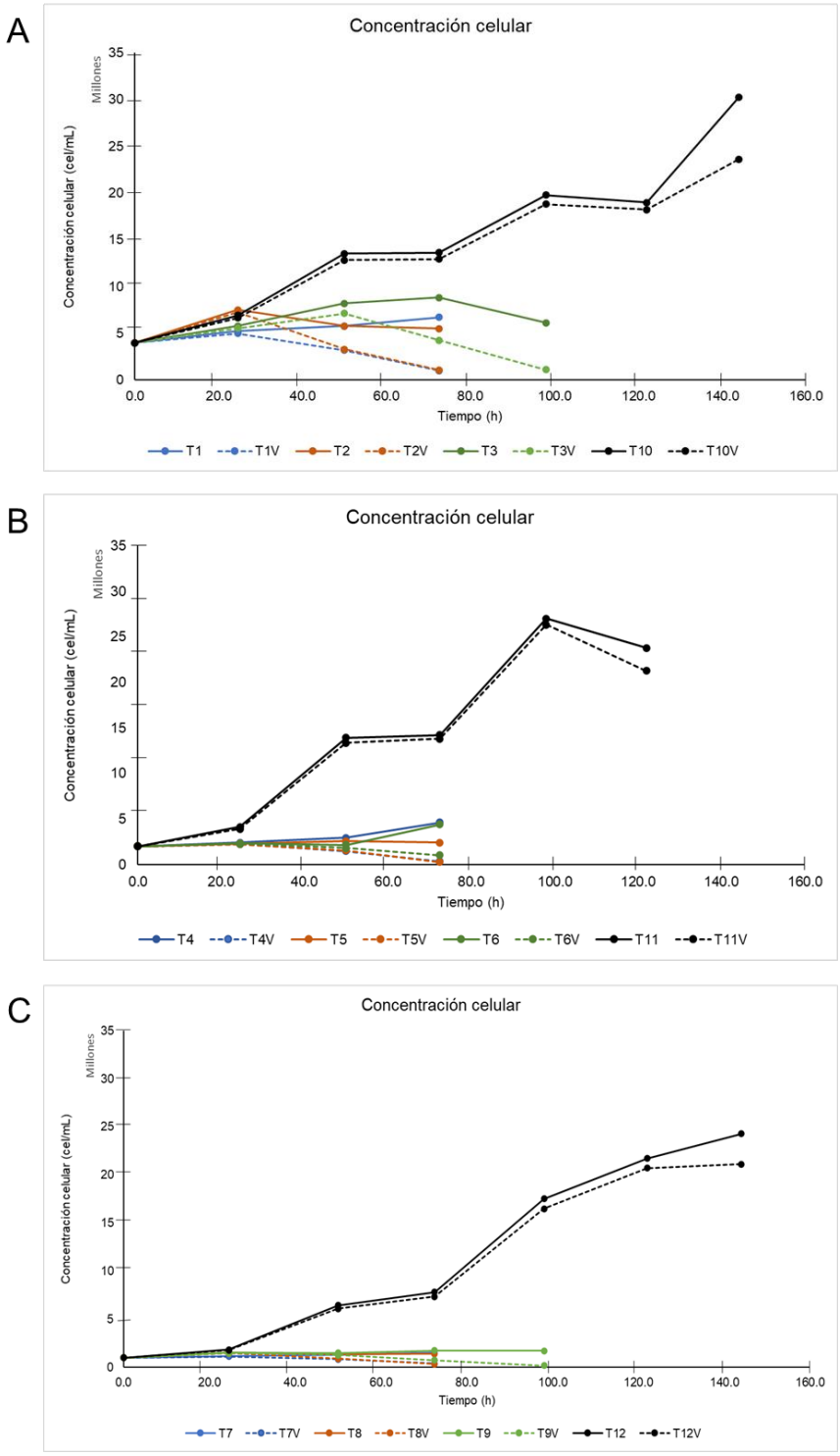


Figura 18. Gráficas de crecimiento correspondientes a tratamientos para optimización. Se muestra la variación de la concentración celular a lo largo del tiempo para los tratamientos en la tabla 2. La concentración celular inicial se presenta separada en: A) TDI de 4 x 106, B) TDI de 2 x 106 y C) TDI de 1 x 106. Las líneas representan: azul, MDI de 5 UFP/mL; naranja, MDI de 2.5 UFP/mL; verde, MDI de 0.5 UFP/mL; y negro, control (células sin infectar). Las líneas sólidas muestran la concentración celular total, mientras que las líneas punteadas muestran la concentración celular viable.

Las muestras se centrifugaron a 4000 g durante 10 min. El sobrenadante (Figura 19) y el pellet (anexo 10.3) fueron evaluados mediante WB para observar la producción de la proteína VP6.

Se aprecia que los tratamientos a una MOI de 5 UFP/cel y a 2.5 UFP/cel tienen producción de VP6 desde las 24 hpi, alcanzando una mayor producción a las 72 h, mientras que en los tratamientos con una MDI de 0.5 UFP/cel se empieza a observar la expresión de VP6 hasta las 50 hpi, teniendo una mayor producción a las 72 hpi para T6 y a las 98 hpi para T3 y T9.

Considerando los resultados mostrados en la figura 19A-C se realizó un análisis de cuantificación relativa, de donde se seleccionaron los tiempos con mayor producción de cada condición y se realizó una comparación en la producción de cada tratamiento *(*Figura 19D).

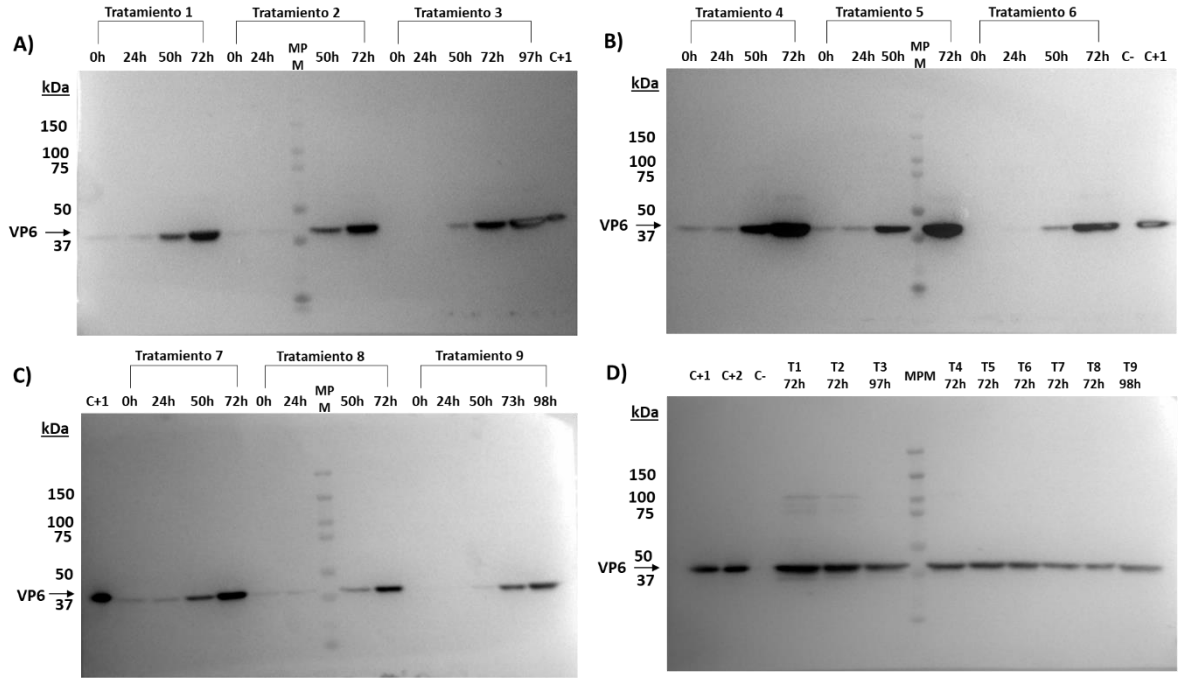


Figura 19. WB del sobrenadante clarificado obtenido durante la cinética de optimización de la producción de la proteína VP6. Cada pozo contuvo la misma cantidad de muestra para su comparación. C+1 corresponde al stock de NTVP6, mientras que C+2 representa el mismo stock a una concentración 1.4 veces mayor. A) Tratamientos correspondientes a TDI de 4 x 10^6 cel/mL. B) Tratamientos correspondientes a una TDI

de 2 x 10^6 cel/mL. C) muestras correspondientes a una TDI de 1 x 10^6 cel/mL. D) Western blot utilizando los tiempos donde se vio la mayor producción de los tratamientos.

El gel de la figura 19D incluye dos controles positivos (C+): el primero (C+1) corresponde a 700 ng de NTVP6 y el segundo (C+2) corresponde a 1000 ng de proteína. Ambos se emplearon para la cuantificación relativa de las bandas de las muestras. Para ello, se utilizó el software Image Lab 6.1, el cual genera el parámetro de cantidad relativa (Rel. Quant.) al comparar la intensidad de cada banda con una banda de referencia; en este caso, las muestras fueron normalizadas frente a los controles positivos.

Los valores obtenidos mediante la herramienta Rel. Quant al comparar cada banda con los C+1 o C+2 se transformaron en cantidades aproximadas de proteína (ng) multiplicando la concentración conocida de cada control positivo por el valor relativo correspondiente calculado para los 15 µL de muestra analizados. Posteriormente, los valores estimados de ambos controles se promediaron, y los resultados finales se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Cuantificación relativa de tratamientos.

Tratamiento	Concentración de VP6 (mg/L)
T1	146.7
T2	106.9
T3	73.8
T4	64.9
T5	65.5
T6	48.9
T7	39.2
T8	30.4
T9	41.7

En la tabla 10 se realizó la comparación de los nueve tratamientos evaluados y la concentración de VP6 aproximada en el sobrenadante de la muestra. Esto permitió observar que el mayor rendimiento de VP6 se obtuvo con el tratamiento 1 (T1), que correspondió a una TDI de 4x10^6 cel/mL infectadas a una MDI de 5 UFP/cel. En general se apreció que los tratamientos con mayor densidad celular y valores elevados de MDI favorecieron la producción de proteína en el sobrenadante,

mientras que aquellos con densidades iniciales menores (T7-T9) mostraron concentraciones más bajas.

Originalmente, la producción de NTVP6 se realizó utilizando las condiciones equivalentes al tratamiento 9 ($1x10^6$ cel/mL, 0.5 UFP/cel), del cual se obtuvo un rendimiento de 0.073 mg/L. Gracias a la comparación de los rendimientos obtenidos para cada tratamiento (Tabla 10) se identificaron las condiciones con mayor producción, así como el incremento de la cantidad de VP6 presente en el sobrenadante tras la optimización de parámetros como la TDI y la MDI.

Para la producción de NTVP6 a partir de la optimización, en un volumen de 600 mL de cultivo, fue necesario considerar la disponibilidad del pase 2 de bacVP6, ya que el volumen requerido para replicar las condiciones del tratamiento 1 excedía la cantidad disponible. El T5 (MDI de 2.5 UFP/cel, TDI de 2×10^6 cel/mL) fue seleccionado sobre los demás por la concentración obtenida y el volumen de inóculo requerido. Otra condición a considerar fue T3 (MDI de 0.5 UFP/cel, TDI de 4×10^6 cel/mL) la cual tuvo una mayor concentración de VP6 con un menor volumen de inóculo, sin embargo, T5 alcanzó el punto óptimo de cosecha en un menor tiempo que el T3, lo cual favoreció su implementación a mayor escala.

La elección de T5 también se sustentó en consideraciones teóricas: de acuerdo con Palomares & Ramírez (2001), una MDI de 5 o mayor puede resultar poco práctica en producción a mayor escala, ya que requiere grandes volúmenes de inóculo. Asimismo, una infección demasiado temprana reduce la cantidad de células disponibles para la producción de proteína recombinante , mientras que una infección tardía puede conducir al agotamiento de metabolitos y a un estado fisiológico desfavorable. En concordancia, Palomares et al. (2015) señalan que las infecciones a MOI altas (≥2 PFU/cel) permiten una infección sincrónica y altamente reproducible. Bajo todas estas consideraciones, las condiciones seleccionadas para la siguiente producción fueron una MDI de 2.5 UFP/cel, a un TDI de 2×10^6 cel/mL.

6.1.4.- Producción de NTVP6 a partir de optimización

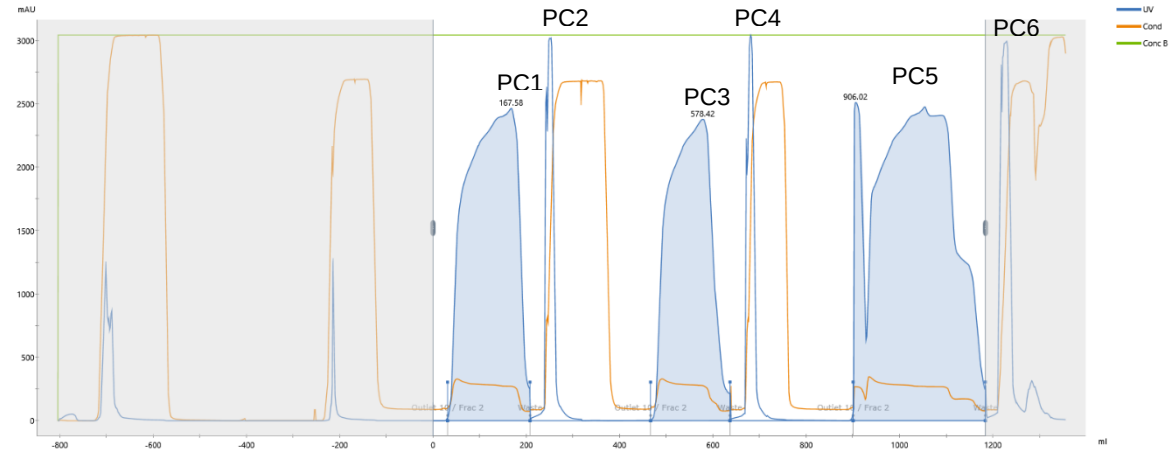
A partir de la optimización se realizó una tercera producción (Tabla 11), en la cual se mantuvo la esterilidad filtrando tanto el sobrenadante clarificado como el pico 1 de CEM por membranas de 0.22 µm. Este método resultó en tubos rotos, posiblemente debido a la fuerza mecánica a la que fueron sometidos (anexos 10.5). Por lo tanto, se decidió realizar una cuarta producción (Tabla 11).

Tabla 11. Condiciones y resultados obtenidos a partir de tercer y cuanta producción

Producción	TOI (cel/mL)	MOI (UFP/cel)	Vol. total (mL)	Muestra	Inyecciones	GP64	Esterilización	Rendimiento (mg/L)	Formación de NTVP6
PV3	$2X10^6$	2.5	600	Sobrenadante clarificado filtrado 0.45 µm	2	Si (intermedio)	Filtrado por 0.22 µm	0.2	No
PV4	$2X10^6$	2.5	600	Sobrenadante clarificado	3	Si (menor)	$NaNO_3$ 0.03%	0.102	Si

Debido al análisis realizado sobre la saturación de la columna y la elución de GP64, se decidió efectuar tres inyecciones del sobrenadante clarificado en la columna de CIA (Figura 20A). Los volúmenes de las inyecciones fueron de aproximadamente 150 mL, 150 mL, y 210 mL, realizando una limpieza de la columna entre cada una. Estas 3 colectas (PC1, PC3 y PC5) fueron mezcladas y concentradas para posteriormente purificarla por CEM (Figura 20B). El pico 1 se analizó para comprobar la presencia de NTVP6, y los demás picos fueron colectados para observar la presencia de VP6 no ensamblada (P2, P3, P4 y P5). Este cromatograma es diferente del reportado por Plascencia-Villa et al. (2011), por el hecho de que existen más picos, aunado a que el pico 6, que representa otras proteínas recombinantes de menor peso molecular, es menor en comparación al obtenido por ellos; sin embargo, este último pico se asemeja al cromatograma de Liñan Torres (2019), lo cual puede indicar que la diferencia se deba al medio utilizado.

A)



B)

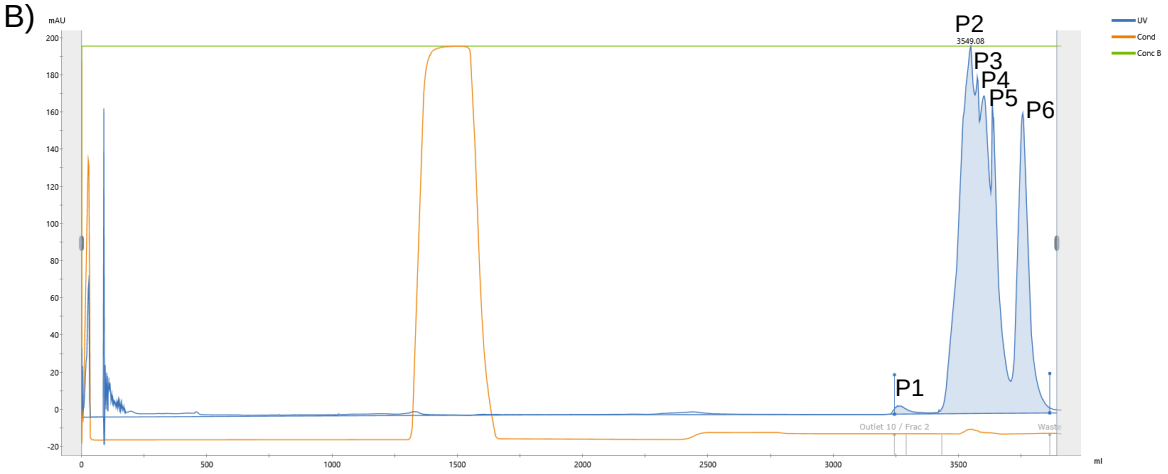


Figura 20. Cromatogramas de purificación. Purificación de NTVP6 en condiciones optimizadas. A) cromatograma de CIA, B) cromatograma de CEM. Marcando los picos como "P". En el eje Y se encuentra el valor de absorbancia en mAu, y el eje X corresponde a mL.

Se analizaron los pasos de purificación mediante SDS-PAGE y WB (Figura 21). En la figura 21A se analizó el gel de WB anti-GP64 de CIA, en este no se observó presencia del contaminante GP64 en las inyecciones realizadas (Figura 21A), además se observó la presencia de bandas difusas en la muestra del concentrado por centricón (Figura 21A carril 9), así como en la tinción con azul de Coomassie (21E y 21F), lo cual es clave para trabajar en bioconjugación con los NTVP6 producidos. También se observó que no hay una cantidad representativa de remanentes de VP6 en la columna de CIA (figura 21B, carril 7) y que la mayor

cantidad de VP6 se obtuvo en el pico 1 de CEM, indicando una recuperación mayoritaria de la proteína.

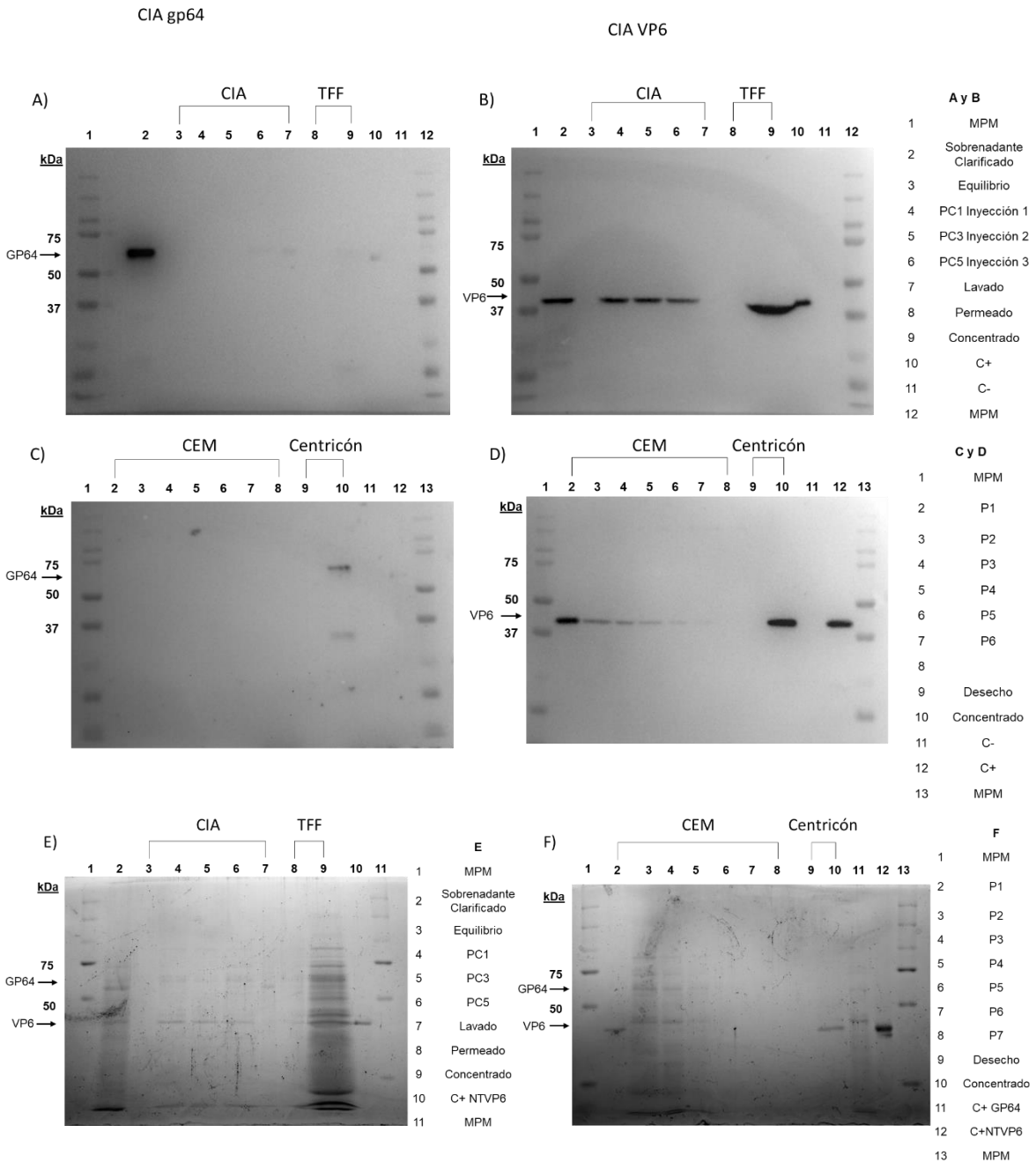


Figura 21. SDS-PAGE y WB de la purificación de NTVP6 optimizados. Se empleó el marcador Dual Color (MDC). Como controles se incluyeron células *Sf9* sin infectar como C-, GP64 como C+ para A y C, y NTVP6 como C+ en B y D. Se muestran los resultados de WB de muestras obtenidas por CIA y TFF con A) anticuerpo anti-GP64 y B) anticuerpo anti-VP6. Asimismo, se muestran los WB con C) anti GP64 y D) anti-VP6 de muestras

obtenidas por CEM y centricón. En E y F se presentan los geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie correspondientes a las muestras de E) CIA/TFF, y F) CEM/centricones.

El pico 1 de CEM concentrado fue caracterizado para analizar los NTVP6. No obstante, mediante MET no se observaron partículas nanotubulares. Por otro lado, el análisis de DLS reveló un comportamiento más cercano al descrito para nanoesferas de VP6, de acuerdo con lo reportado por Tamminen et al. (2020). Por lo tanto, se buscó concentrar más la muestra, realizando una concentración por centrifugación al vacío (Savant). Posteriormente se resuspendió la muestra en 120 μL de buffer C, y adicionando NaN_3 al 0.02% para mantener la esterilidad de la muestra, ya que como se demuestra en el anexo 10.5, los NTVP6 no se mantuvieron tubulares al ser filtrados por un filtro de 0.22 μm.

El resultado de la concentración al vacío se muestra en la figura 22, donde se observa un aumento significativo de partículas con un Rh mayor y más parecido a los NTVP6 (Figura 22B), pero se observa una coexistencia de nanotubos y nanoesferas de VP6, confirmada al tomar las micrografías de la muestra por TEM (Figura 22C), lo cual de acuerdo con Erk et al. (2003) corresponde a un pH entre 5 y 7.

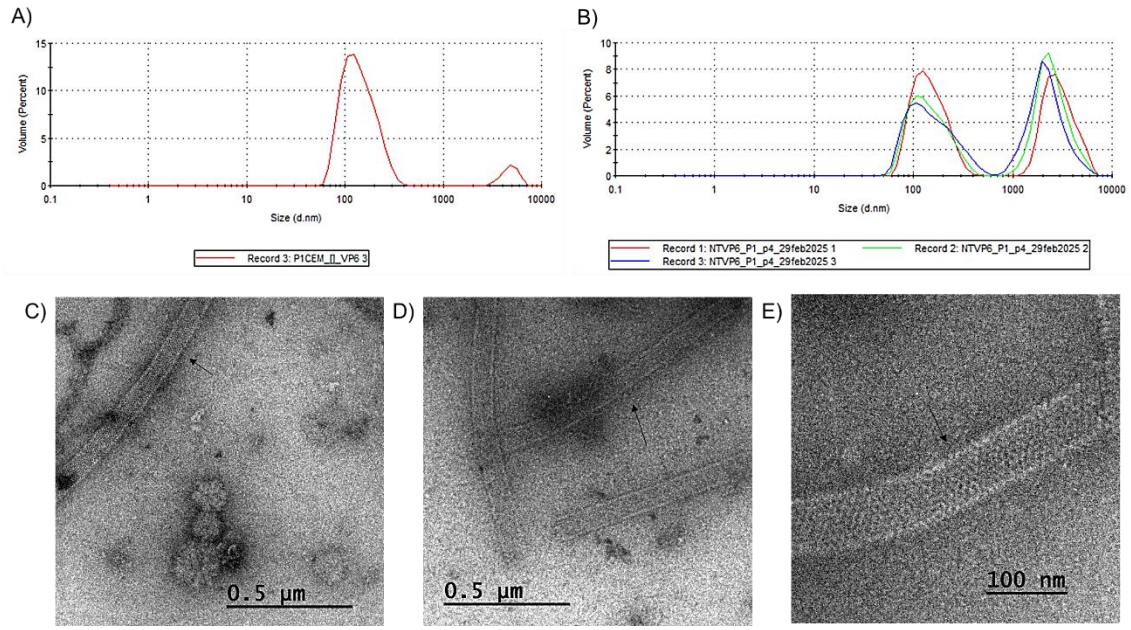


Figura 22. Caracterización de NTVP6 en condiciones optimizadas. A) DLS de pico 1 de CEM concentrado por centricón, Rh de pico 1: 151 nm, Rh pico 2: 4814 nm, B) DLS de posterior concentración por Savant, distribución bimodal, Rh de pico 1: 151 nm, Rh pico 2: 3043 nm, Se muestran micrografía de NTVP6 obtenidos en esta purificación, C y D) aumentos a16,000x y E) a 50,000 x.

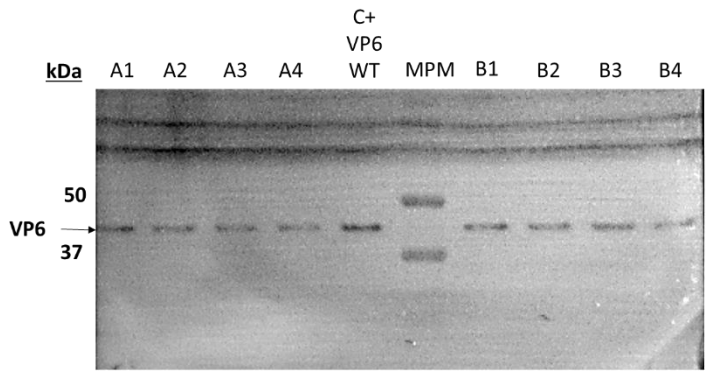
6.2.- Bioconjugación

6.2.1.- Ensayo preliminar para bioconjugación

Para comprobar la funcionalidad del linker AMAS, se realizó una primera prueba de concepto, utilizando los NTVP6 del C+ (Figura A2) y el péptido S2 proveniente de los epítopos T de SARS-CoV-2, de acuerdo a lo establecido en la sección 5.8. La conjugación completa Péptido-AMAS-NTVP6 (PAN) se mantiene a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente, se llevaron a cabo análisis mediante SDS-PAGE y WB (Figura 23), esperando un cambio de aproximadamente 2 kDa en el peso del monómero de VP6.

En la figura 23 se pueden observar los resultados del WB realizado para las diferentes condiciones de bioconjugación, sin embargo no se observan diferencias claras en las bandas de VP6 que permitieran confirmar la bioconjugación, lo cual se podría atribuir a que el cambio de peso es menor a lo que se podría apreciar

visualmente, que el gel de poliacrilamida no se encontraba en el porcentaje adecuado para resolver la diferencia de 2 kDa, o que al utilizar un buffer de carga desnaturalizante y reductor con β-mercaptoetanol, los puentes disulfuro formados entre la cisteína de VP6 y el grupo maleimida del linker AMAS pudieron reducirse a un grupo tiol, lo que provocó la separación del péptido.



Muestra	*[P] (mM)	**T (°C)	Tiempo	µg ***PA	ng NTVP6
A1	0.1	24	30 min	0.0078	200
A2	0.01	24	30 min	0.0078	200
A3	0.1	4	4 h	0.0078	200
A4	0.01	4	4 h	0.0078	200
B1	0.1	24	30 min	0.08	2500
B2	0.01	24	30 min	0.08	2500
B3	0.1	4	4h	0.08	2500
B4	0.01	4	4h	0.08	2500

Figura 23. WB anti-VP6 del ensayo preliminar de bioconjugación. Identificación del peso aproximado en kDa de ocho condiciones de bioconjugación diferentes, estimadas alrededor de 45 kDa, peso correspondiente al monómero de VP6 (Izquierda). Las condiciones se muestran en la tabla de la derecha (Tabla 4).

Por lo mencionado anteriormente, se realizó un SDS-PAGE de la comparación entre condiciones desnaturalizantes reductoras (DyR) y no reductoras ante la bioconjugación (Figura 24).

En esta prueba se observó un ligero cambio entre los carriles con condiciones DyR (carriles 1,3) y los carriles con condiciones D (carriles 2,4,5); sin embargo, esta diferencia se debió principalmente a la concentración de muestra aplicada y no fue representó evidencia suficiente para concluir el éxito de la bioconjugación. Por ello, se planteó un análisis más sensible de detección, tomando en cuenta lo reportado por Peralta et al. (2009), quien insertó un péptido de 14 aa, se recurrió a realizar un WB anti-epítopo.

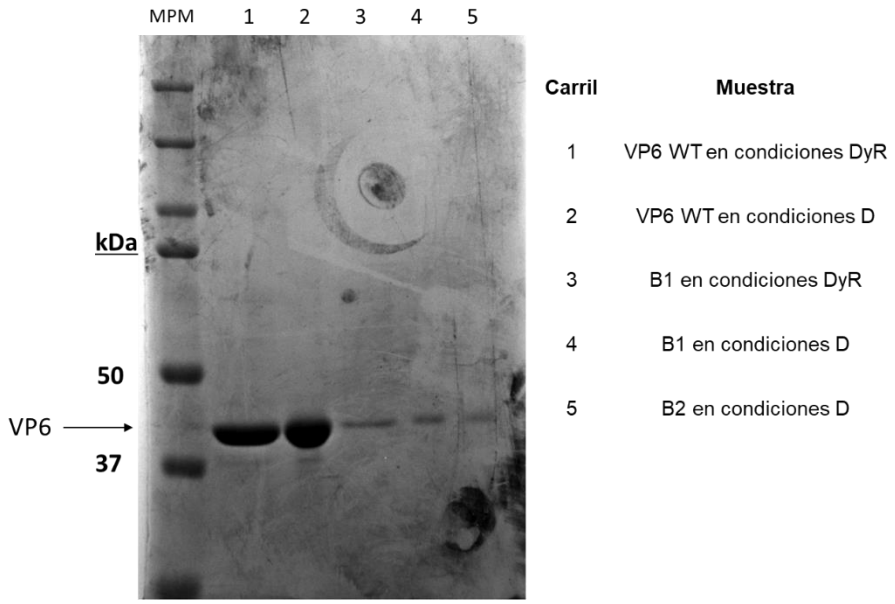


Figura 24. Pruebas de bioconjugación analizadas por SDS-PAGE. SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie, se comparan tratamientos de bioconjugación con condiciones desnaturalizantes (D) o desnaturalizantes y reductoras (DyR) en NTVP6 nativos (WT) y en NTVP6 bioconjugados. Muestras B1 y B2 explicadas en tabla 4.

6.2.2.- Ensayo de bioconjugación probando péptidos y NTVP6 diferentes

Para esta prueba se utilizó el suero humano de un individuo recuperado de COVID-19, el cual representa un anticuerpo policlonal.

Debido a que la muestra obtenida en la bioconjugación previa se agotó durante las diversas caracterizaciones, se realizó una nueva bioconjugación utilizando la condición B1, probando tanto el péptido S1 como el péptido S2. Posterior a la incubación la bioconjugación fue resguardada a 4°C durante toda la noche, para después conjugarlo los NTVP6 del C+, de la PV1 y de la PV3. Se realizaron WB donde se analizó la presencia de VP6 *(*Figura 25A), la presencia del péptido de SARS-CoV-2 (Figura 25B) utilizando el suero humano, y un WB con ambos procedimientos (Figura 25C). En la figura 25A se comprobó la presencia de la proteína VP6 para todas las muestras, observando que algunos carriles muestran 2 bandas de muy poca diferencia de tamaño. Esta doble banda se encuentra también

en las muestras no conjugadas (WT), por lo tanto se descarta que sean causadas por la asociación a los péptidos.

La figura 25B corresponde un WB utilizando el suero humano. se logró apreciar que no existe una señal a los 45 KDa, sin embargo, se observó una señal inespecífica en el carril de la segunda producción con la bioconjugación al péptido S1 de un tamaño mayor a 150 KDa. La señal inespecífica podría deberse al suero empleado del individuo recuperado de COVID-19.

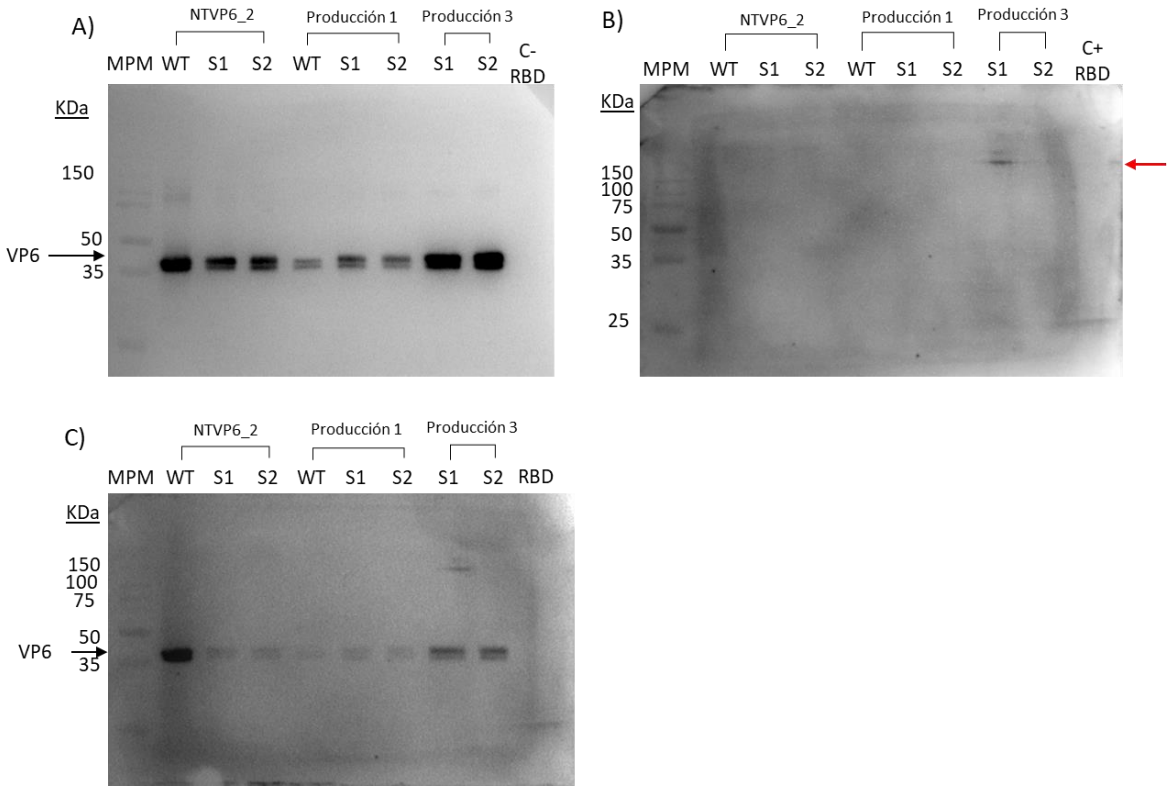


Figura 25. Caracterización de la segunda prueba de concepto de Bioconjugación. NTVP6 de diversas producciones conjugados con péptido S1 o S2. A) WB anti-VP6, B)WB anti-COVID, C) Superposición de A y B.

Otras posibles causas de la presencia de esta banda pueden ser debido a que VP6 si está desplegando el péptido por bioconjugación, sin embargo se encontraría desplegado en una conformación de VP6 no monomérica, posiblemente trimérico.

Siguiendo esta posibilidad, se puede suponer que no hay otra señal para el resto del gel debido a la conformación inicial de VP6, ya que tanto en el C+ como en la

primera producción se observó la presencia de nanotubos, mientras que en la segunda producción se vio más bien proteína dispersa, probablemente en forma de trímeros al ser la estructura más estable (Mathieu et al., 2001), lo que podría suponer que en esta segunda producción el péptido este asociando a cisteínas que no se encontrarían disponibles en nanotubos (Cys96 y Cys331), o al hecho de que los nanotubos interfieran para el proceso de bioconjugación.

La banda también podría representar la unión del péptido a trímero de GP64 (174 kDa), ya que el peso podría concordar más con este resultado y esta teoría sería apoyada por la presencia de GP64 en el anexo 10.5 (Figura A4). En la figura 25C se muestra la membrana con la superposición de la figura 25A y 25B, utilizados para identificar correctamente el carril al que pertenece la señal no específica.

Se replicó el gel realizando primero una corroboración de la identificación de la señal de suero 137 con diferentes controles positivos como RBD y la proteína S (Figura 26A). En este se apreció una banda en el carril donde se agregó la proteína S la cual pesa aproximadamente 140 kDa (Rebelo et al., 2022), por lo tanto, este control fue usado para replicar el proceso con los NTVP6 de la última producción (Figura 26B) en donde se observó una banda en la conjugación con el péptido S1, en un tamaño entre 100 y 150 kDa lo cual correspondería con el peso de un trímero de VP6.

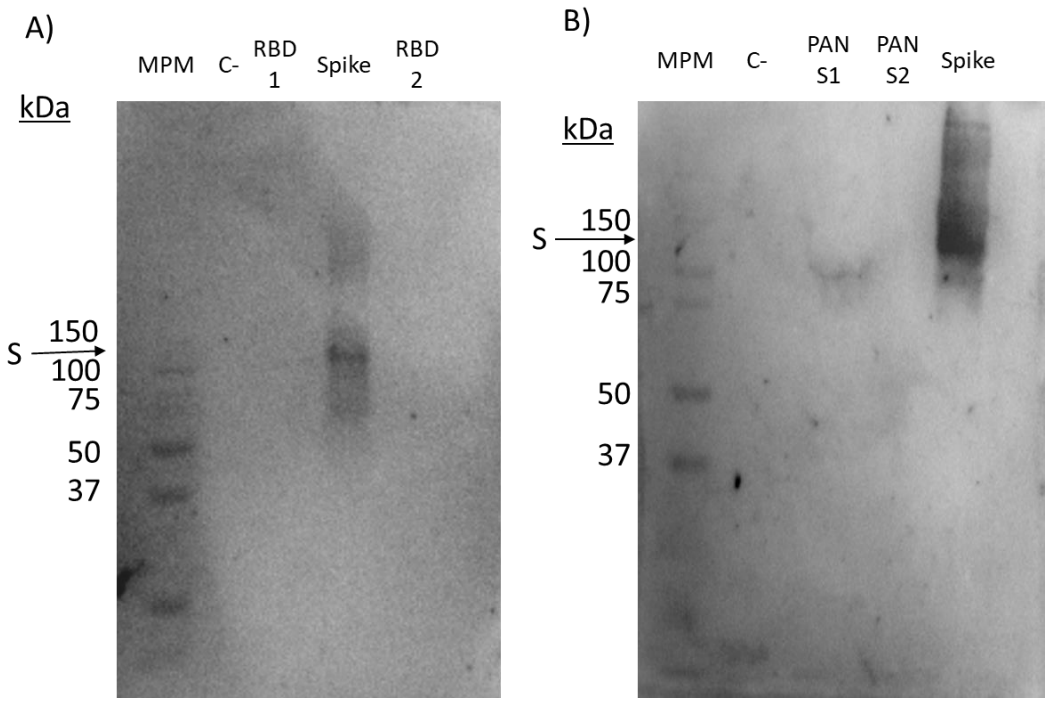


Figura 26. Evaluación de la reactividad de anticuerpos frente a RBD y proteína Spike. A) Prueba de suero de un paciente positivo para COVID con diferentes controles como RBD y la proteína spike. B) Repetición de análisis de PAN con NTVP6 de última producción.

Cabe destacar que los péptidos empleados corresponden a epítopos T, lo que limita su reconocimiento por los anticuerpos utilizados en WB, técnica más adecuada para epítopos B. No obstante, se ha descrito que algunos péptidos que funcionan como epítopos T pueden contener regiones que son reconocidas por anticuerpos; esto puede deberse al solapamiento con epítopos B (Bergmann-Leitner et al., 2013; Harris et al., 1996). Algunos análisis realizados por Wang et al. (2020) han identificado que en el caso de la proteína Spike de SARS-CoV-2 existen zonas donde los epítopos T y B concurren, lo que podría explicar que el péptido S1 presente la señal observada.

En conjunto, los resultados muestran limitaciones para confirmar de manera concluyente la bioconjugación del péptido a los NTVP6; sin embargo, es probable la asociación del péptido a estructuras de mayor peso molecular, como los trímeros de VP6, manteniendo condiciones no reductoras. Esto es consistente con estudios previos, en los que se demostró que la unión de péptidos a VP6 puede mantenerse

estable únicamente bajo condiciones no reductoras y mediada por residuos específicos como cisteínas (Frenchick et al., 1992).

6.3.- Construcción del plásmido pJET1.2_VP6-G15

Como se ha mencionado previamente, es posible desplegar péptidos sobre la superficie de proteínas virales mediante métodos de ingeniería genética (Lei et al., 2020). En este trabajo se evaluó la inserción del péptido S2 en la región 171-172 del gen VP6, ya que esta sección corresponde a una región intrínsicamente desordenada (loop), lo que favorece la inserción de insertos sin impactar en la estructura de la proteína (Pan et al., 2016).

6.3.1.- Obtención de gen VP6

Para este fin, se analizó el gen de VP6 de la cepa SA11, presente en dos vectores diferentes: pJET1.2-RBS_VP6 (vector A) y en pSB1T3_VP6 (vector T), validando la presencia del gen mediante digestión enzimática (Figura 27), utilizando diferentes enzimas de restricción para cada plásmido.

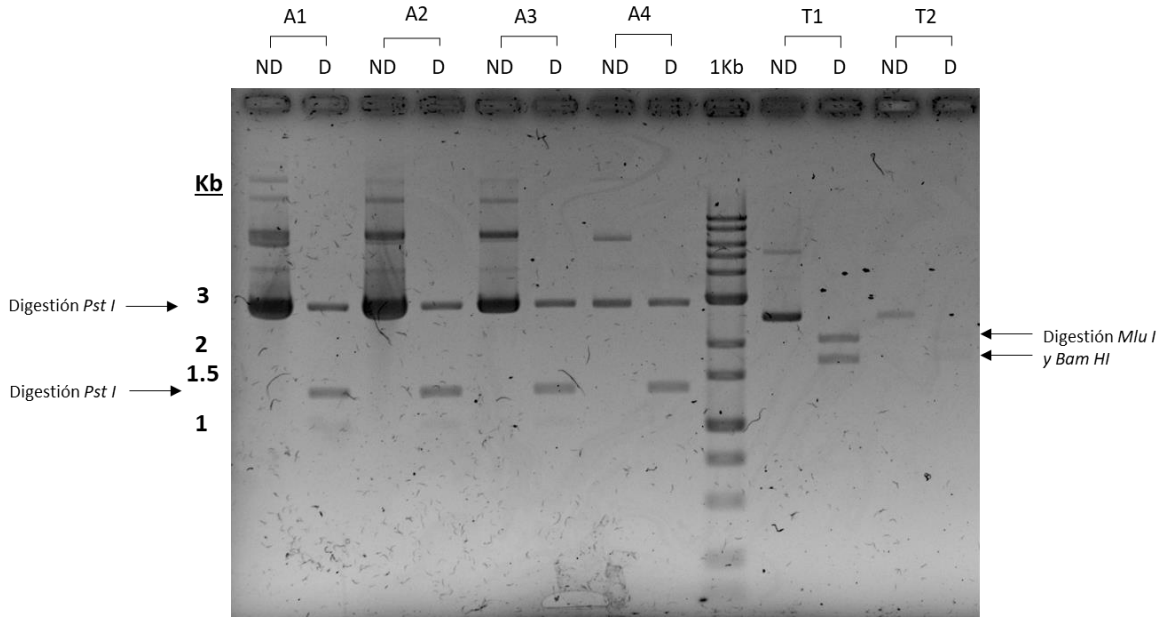


Figura 27. Análisis de restricción de plásmidos pJET1.2-RBS_VP6 (A) y pSB1T3_VP6 (T). El vector A fue digerido con PstI, mientras que el vector T fue digerido con MluI y BamHI.

En la figura 27 el uso de la enzima PstI (R0140, NEB) en el vector A generó los dos fragmentos esperados de 2856 pb y 1368 pb, confirmando que todas las colonias analizadas eran positivas; se seleccionó la colonia A1 para secuenciación. En el vector T, las digestiones con BamHI (R0136, NEB) y MluI (R0198, NEB), dieron lugar a dos bandas, una de 2195 pb y la otra de 1458pb, siendo positivas las colonias T1 y T2, donde por la densidad de la banda se puede asumir que T2 tiene menor concentración que T1, por lo tanto esta última se seleccionó para su secuenciación.

La secuenciación (Figura 28) confirmo que A1 contenía la secuencia íntegra de VP6, idéntica a la reportada para la cepa SA11 de rotavirus, mientras que T1 contiene la mayor parte de la secuencia del VP6 pero con algunas bases degeneradas. Por lo tanto se selecciona el vector A cepa 1 para la obtención del gen.

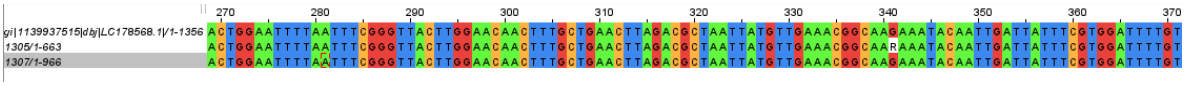


Figura 28. Alineamiento de la secuencia del gen VP6. Se muestra la secuencia de referencia VP6 de la cepa SA11 en la fila superior (ID: 7011372), comparada con la secuencia de T1 en la fila central y A1 en la fila inferior señalada en gris.

6.3.2.- Clonación de fragmento G15 en pJET1.2

Con el fin de preservar y multiplicar el fragmento sintético G15 (Tabla 6), se llevó a cabo su clonación en el vector pJET1.2 utilizando el kit comercial de clonación. El plásmido recombinante pJET1.2-G15 fue introducido en células *E. coli* quimio competentes TOP10, utilizando como método de selección el gen de resistencia a ampicilina encontrado en el vector.

Los resultados de la PCR de colonia (Figura 29A), realizada con los oligonucleótidos Fw_pJET y RV_pJET (tabla 5), confirmó la presencia del fragmento esperado de 900 pb en las colonias 2 y 3. Ambas colonias fueron sometidas a digestión enzimática con ApaI y PstI, con la cual se obtuvieron los fragmentos esperados de 2837 pb y 917 pb (Figura 29B), lo que confirmó la presencia del fragmento clonado.

La secuenciación validó la integridad de la inserción en la colonia 2, la cual fue preservada en glicerol al 80% como stock.

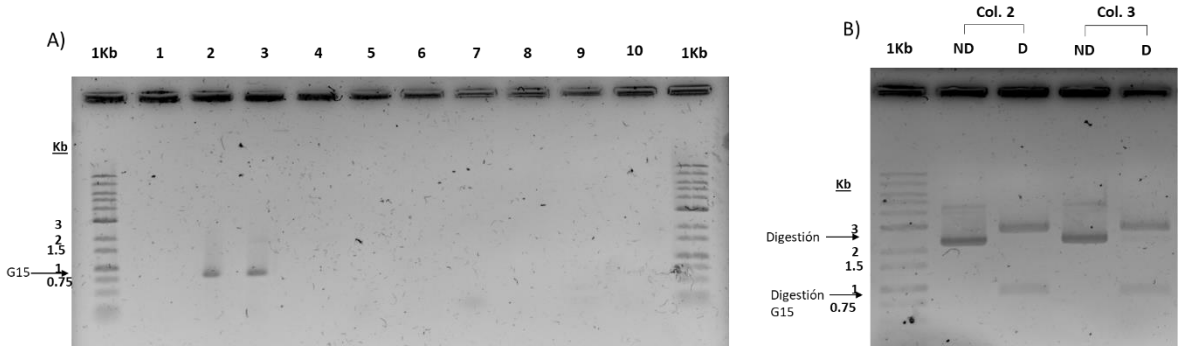


Figura 29. Clonación de fragmento G15 en pJEt1.2. A) PCR de colonia, banda positiva de 900 pb. B) patrón de restricción de colonias 2 y 3 con ApaI y PstI, bandas esperadas para resultado positivo 2837 pb y 917 pb.

6.3.3.- Inserción de fragmento G15 en VP6

El gen VP6 (1370 pb) y el fragmento G15 (900 pb) se amplificaron utilizando tanto 1 ng de templado como 0.5 ng para cada uno. Posteriormente los productos de PCR fueron digeridos con BstAPI para la generación de extremos cohesivos, y al realizar el gel mostrado en la figura 30A se observaron bandas positivas para ambos templados en ambas cantidades. Las bandas obtenidas fueron extraídas de banda utilizando el kit de extracción de DNA (Monarch®, New England Biolabs).

Tras la purificación ambos fragmentos fueron ligados durante 1 h a 37 °C y posteriormente se realizan dos metodologías; la ligación se guardó a 4°C (A) o se purificó por columna (B). Subsecuentemente se evaluaron mediante PCR utilizando diferentes cantidades de templado (0.1 µL, 2 µL y 5 µL), del cual se obtuvo un producto positivo de 1284 pb correspondiente a la construcción VP6-G15 (Figura 30B) para las condiciones B, obteniendo una banda más marcada en B3.

El amplicón del fragmento VP6-G15 fue clonado en pJET1.2, generando colonias transformadas de *E. coli* TOP10. La clonación se realizó utilizando el kit de pJET1.2,

sin utilizar ninguna enzima de digestión para la asociación al vector, pues se encuentra con extremos romos por la PCR previa.

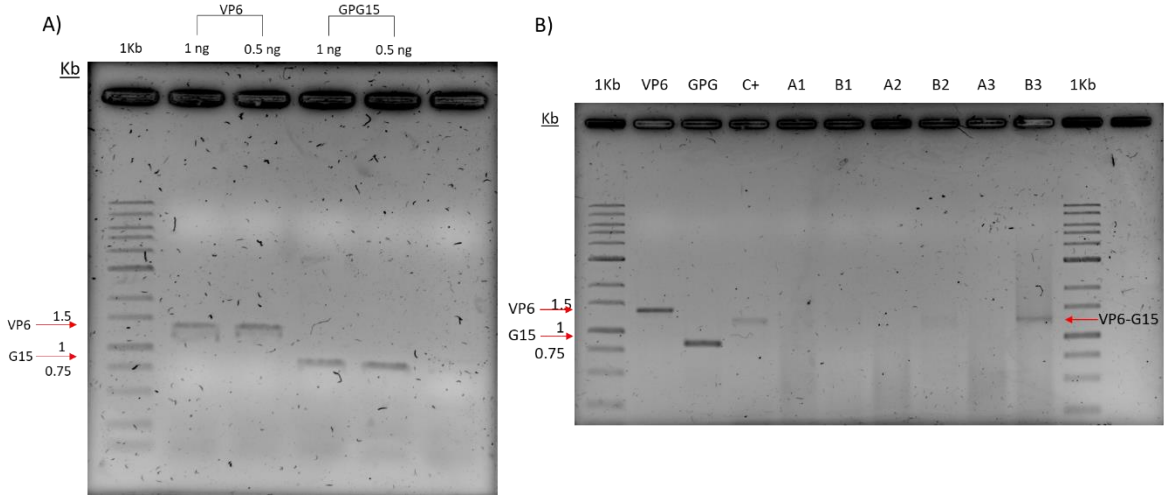


Figura 30. Amplificación y ligación in vitro del gen de VP6 y fragmento G15. A) PCR de gen VP6 (1370 pb) y fragmento G15 (900 pb), utilizando 1 ng y 0.5 ng del templado. B) PCR de fragmento ligado se espera banda de 1284 pb. VP6: amplicón de VP6 obtenido en la figura 35A. GPG: amplicón positivo de GPG. C+: amplicón de VP6 con diferentes oligonucleotidos (Rv_pJET y Fw_pJET). A: se guarda a 4 °C después de tiempo de ligación. B: la ligación purificada por columna y almacenada a 4 °C. los números representan 1: 0.1 µL, 2: 1 µL y 3: 5 µL de templado.

La PCR de colonia permitió vislumbrar un único resultado positivo de 1284 pb en la colonia 4 (Figura 31A). Posteriormente se propago la colonia 4 en dos tubos de ensayo obteniendo 4.1 y 4.2. La presencia del gen VP6-G15 se verifico por digestión enzimática, sumada a la verificación de la digestión de pJET1.2_VP6, amplicón VP6 y amplicón G15.

La digestión enzimática realizada a esta colonia pJET1.2_VP6-G15 (4.1 y 4.2) indicó patrones compatibles con la inserción esperada (Figura 31B) al obtener una banda de 4313 pb al digerirse con BstAPI, o al digerirse con BstAPI y XhoI resultarían dos bandas de 3563 pb y 750 pb.

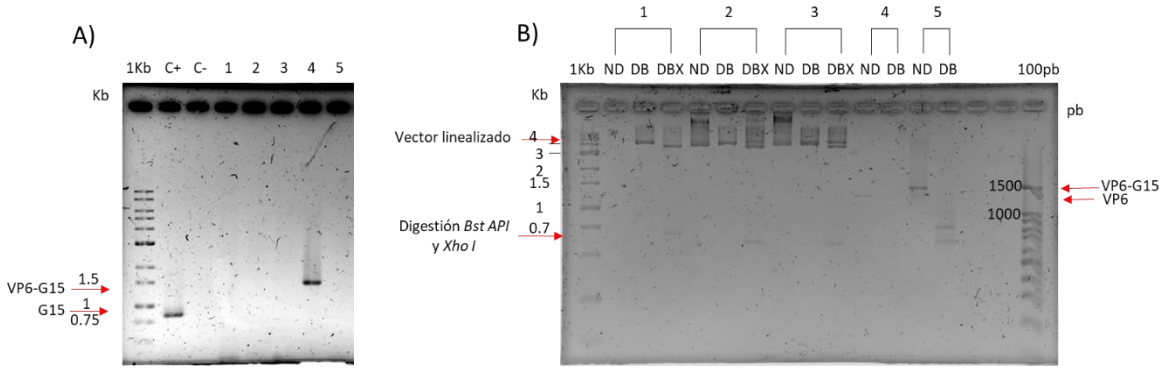


Figura 31. Clonación del Fragmento VP6-G15 en pJET1.2. A) PCR de colonia, con un producto esperado de 1284 pb. C+: amplicón de G15 obtenido de pJET1.2_G15. B) Patrón de restricción. ND; No digerido. DB; digerido con BstAPI. DBX; digerido con BstAPI y XhoI. 1: pJET1.2_VP6. 2: pJET1.2_VP6-G15 colonia 4.1. 3: pJET1.2_VP6-GPG15GPG colonia 4.2. 4: Amplicón de VP6. 5: Amplicón de VP6-G15.

Sin embargo, la secuenciación de la colonia 4.1 reveló que la construcción no contenía una secuencia 100% idéntica a la esperada para el fragmento VP6-G15 (Figura 32), ya que se detectaron mutaciones puntuales en el inserto. Aunque la metodología B permitió obtener un amplicón del tamaño esperado y un clon positivo por PCR, la secuencia final mostró discrepancias específicas en la región del inserto VP6-G15. Estas variaciones podrían deberse a un apareamiento subóptimo de los oligonucleótidos utilizados durante la amplificación, o a errores introducidos por la polimerasa utilizada para la PCR.

Estos hallazgos sugieren la necesidad de confirmar si las diferencias observadas afectan el marco de lectura o la funcionalidad del inserto, así como reproducir el experimento para obtener una colonia con la secuencia idéntica. También podrían considerarse alternativas para mejorar la estabilidad y fidelidad del constructo, como emplear cepas más estables para ADN recombinante (como Stbl3 o DH10B) o recurrir a métodos de ensamblaje alternativos.

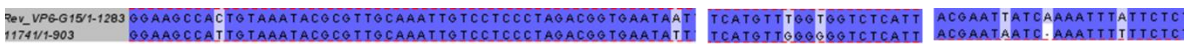


Figura 32. Alineamiento de gen VP6-G15. En la fila superior se observa la conformación in silico de VP6-G15, en la inferior el mismo fragmento obtenido a partir de pJET1.2_VP6-G15. Se señalan sitios con mutaciones puntuales en la secuencia.

7.- CONCLUSIONES

En este trabajo se evaluó el uso de células *Sf9* en medio PSFM para la producción de NTVP6, una combinación de condiciones que no había sido previamente explorada en la producción de estas nanoestructuras. Gracias al trabajo de optimización se determinó que la mayor cantidad de VP6 en el sobrenadante se obtuvo al infectar las células a una TDI de 4 x 10^6 cel/mL con una MDI de 5 UFP/cel.

Se detectó la formación de NTVP6 en las producciones realizadas bajo las dos diferentes condiciones evaluadas, TDI de 1 x 10^6 cel/mL infectado a una MDI de 0.5 UFP/cel, y TDI de 2 x 10^6 cel/mL a una MDI de 2.5 UFP/cel, lo que sugiere que la generación de nanotubos podría ocurrir también bajo otras condiciones no analizadas en este estudio.

Por otro lado, se evaluó la bioconjugación de péptido derivado de epítopos T a NTVP6 mediante el uso del linker AMAS. Aunque los análisis por SDS-PAGE y WB no permitieron confirmar de manera concluyente la unión covalente del péptido al monómero de VP6, los resultados sugieren la posible asociación del péptido S1 a estructuras de mayor peso molecular.

Además, con respecto a la posibilidad de desplegar péptidos mediante ingeniería genética se generó el plásmido pJET1.2_GPG15, que contiene la secuencia del péptido de 15 aa derivado de SARS-CoV-2 (S2). No obstante, aunque fue posible amplificar y detectar el fragmento VP6-G15 por PCR, las inconsistencias observadas en la secuenciación impiden obtener una construcción completamente estable y acorde con la secuencia teórica. Estos resultados remarcan la necesidad de reproducir el proceso, e incluso probar cepas bacterianas más adecuadas para ADN recombinante o la implementación de métodos de ensamblaje alternativos, con el fin de asegurar la correcta clonación y estabilidad del fragmento G15 en el gen VP6. Esta estrategia permitirá evaluar, en trabajos futuros, el ensamblaje de NTVP6 recombinantes que porten epítopos específicos en su superficie.

8.- PERSPECTIVAS

- Completar la optimización del sistema de producción de NTVP6 en células *Sf9* cultivadas en medio PSFM. Realizar réplicas biológicas de los tratamientos realizados en este trabajo para evaluar de forma cuantitativa la expresión de VP6, tanto en el sobrenadante como en el pellet celular.
- Emplear epítopos B en el proceso de bioconjugación que puedan ser reconocidos fácilmente por anticuerpos específicos disponibles comercialmente. Esto facilitaría la detección y validación del proceso de bioconjugación.
- Continuar con la estrategia de ingeniería genética para el despliegue de epítopos derivados de SARS-CoV-2 en la proteína VP6.
- Insertar el gen nativo de VP6 en el vector pFastBac1 para generar el plásmido pFastBac1-VP6, y posteriormente clonar del fragmento G15, con el fin de obtener el plásmido pFastBac1_VP6-G15, el cual podrá emplearse para la producción de un baculovirus recombinante.
- Generar variantes recombinantes de VP6 que puedan ensamblarse como NTVP6 y presentar epítopos virales entre los residuos 171-172.

9.- BIBLIOGRAFÍA

Aucoin, M. G., Perrier, M., & Kamen, A. A. (2006). Production of adeno-associated viral vectors in insect cells using triple infection: Optimization of baculovirus concentration ratios. *Biotechnology and Bioengineering*, *95*(6). https://doi.org/10.1002/bit.21069

Bergmann-Leitner, E. S., Chaudhury, S., Steers, N. J., Sabato, M., Delvecchio, V., Wallqvist, A. S., Ockenhouse, C. F., & Angov, E. (2013). Computational and Experimental Validation of B and T-Cell Epitopes of the In Vivo Immune Response to a Novel Malarial Antigen. *PLoS ONE*, *8*(8). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071610

Boöttger, R., Hoffmann, R., & Knappe, D. (2017). Differential stability of therapeutic peptides with different proteolytic cleavage sites in blood, plasma and serum. *PLoS ONE*, *12*(6). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178943

Brune, K. D., & Howarth, M. (2018). New routes and opportunities for modular construction of particulate vaccines: Stick, click, and glue. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Issue JUN). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01432

Chambers, A. C., Aksular, M., Graves, L. P., Irons, S. L., Possee, R. D., & King, L. A. (2018). Overview of the Baculovirus Expression System. In *Current Protocols in Protein Science* (Vol. 91, Issue 1, pp. 5.4.1-5.4.6). Blackwell Publishing Inc. https://doi.org/10.1002/cpps.47

Chen, W., Hartzell, E. J., Lieser, R. M., & Sullivan, M. O. (2020). Modular hepatitis b virus-like particle platform for biosensing and drug delivery. *ACS Nano*, *14*(10), 12642–12651. https://doi.org/10.1021/acsnano.9b08756

Chung, Y. H., Cai, H., & Steinmetz, N. F. (2020). Viral nanoparticles for drug delivery, imaging, immunotherapy, and theranostic applications. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 156). https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.024

Ding, X., Liu, D., Booth, G., Gao, W., & Lu, Y. (2018). Virus-Like Particle Engineering: From Rational Design to Versatile Applications. In *Biotechnology Journal* (Vol. 13, Issue 5). Wiley-VCH Verlag. https://doi.org/10.1002/biot.201700324

Erk, I., Huet, J.-C., Duarte, M., Duquerroy, S., Rey, F., Cohen, J., & Lepault, J. (2003). A Zinc Ion Controls Assembly and Stability of the Major Capsid Protein of Rotavirus. *Journal of Virology*, *77*(6), 3595–3601. https://doi.org/10.1128/jvi.77.6.3595-3601.2003

Frenchick, P. J., Sabara, M. I. J., Ready, K. F. M., & Babiuk, L. A. (1992). *Biochemical and immunological characterization of a novel peptide carrier system using rotavirus VP6 particles*.

Godiska, R., Mead, D., Dhodda, V., Wu, C., Hochstein, R., Karsi, A., Usdin, K., Entezam, A., & Ravin, N. (2009). Linear plasmid vector for cloning of repetitive or unstable sequences in Escherichia coli. *Nucleic Acids Research*, *38*(6). https://doi.org/10.1093/nar/gkp1181

Gröhn, S., Heinimäki, S., Tamminen, K., & Blazevic, V. (2021). Expression of influenza A virus-derived peptides on a rotavirus VP6-based delivery platform. *Archives of Virology*, *166*(1), 213–217. https://doi.org/10.1007/s00705-020-04847-5

Hadj Hassine, I., Ben M'hadheb, M., Almalki, M. A., & Gharbi, J. (2024). Virus-like particles as powerful vaccination strategy against human viruses. In *Reviews in Medical Virology* (Vol. 34, Issue 1). John Wiley and Sons Ltd. https://doi.org/10.1002/rmv.2498

Hallett, R. F. (1999). *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* (J. C. Lindon, Ed.; Second Edition, Vol. 3). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374413-5.00277-3

Harris, D. P., Vordermeier, H.-M., Arya, A., Bogdan, K., Moreno, C., & Ivanyi Tuberculosis, J. (1996). Immunogenicity of peptides for B cells is not impaired by overlapping T-cell epitope topology. In *Immunology* (Vol. 88).

Hermanson, G. T. (2013). Bioconjugate Techniques: Third Edition. In *Bioconjugate Techniques: Third Edition*. https://doi.org/10.1016/C2009-0-64240-9

Hu, Y. C., & Bentley, W. E. (2001). Effect of MOI ratio on the composition and yield of chimeric infectious bursal disease virus-like particles by baculovirus co-infection: Deterministic predictions and experimental results. *Biotechnology and Bioengineering*, *75*(1). https://doi.org/10.1002/bit.1170

Hussain, W., Yang, X., Ullah, M., Wang, H., Aziz, A., Xu, F., Asif, M., Ullah, M. W., & Wang, S. (2023). Genetic engineering of bacteriophages: Key concepts, strategies, and applications. In *Biotechnology Advances* (Vol. 64). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108116

Invitrogen. (2002). *Bac-to-Bac ® Baculovirus Expression System Blast off to expression*. www.invitrogen.com

Kheirvari, M., Liu, H., & Tumban, E. (2023). Virus-like Particle Vaccines and Platforms for Vaccine Development. In *Viruses* (Vol. 15, Issue 5). MDPI. https://doi.org/10.3390/v15051109

Knipe, D., & Howley, P. (2013). *Fields Virology: Vol. 6th Ed.* (Williams & Wilkins).

Lei, X., Cai, X., & Yang, Y. (2020). Genetic engineering strategies for construction of multivalent chimeric VLPs vaccines. In *Expert Review of Vaccines* (Vol. 19, Issue 3, pp. 235–246). Taylor and Francis Ltd. https://doi.org/10.1080/14760584.2020.1738227

Lepault, J., Petitpas, I., Erk, I., & Navaza, J. (2001). Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus. *EMBO Journal*, *20*(7), 1498–1507. https://doi.org/10.1093/emboj/20.7.1498

Licari, P., & Bailey, J. E. (1992). Modeling the population dynamics of baculovirus-infected insect cells: Optimizing infection strategies for enhanced recombinant protein yields. *Biotechnology and Bioengineering*, *39*(4). https://doi.org/10.1002/bit.260390409

Liñan Torres, A. (2019). *Evaluación de la respuesta inmune humoral frente al uso de nanotubos de VP6 de Rotavirus como adyuvante para una vacuna contra el virus Zika compuesta por la proteína de la envoltura viral*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Malm, M., Tamminen, K., Lappalainen, S., Vesikari, T., & Blazevic, V. (2016). Rotavirus Recombinant VP6 Nanotubes Act as an Immunomodulator and Delivery Vehicle for Norovirus Virus-Like Particles. *Journal of Immunology Research*, *2016*. https://doi.org/10.1155/2016/9171632

Malm, A. V., & Corbett, J. C. W. (2019). Improved Dynamic Light Scattering using an adaptive and statistically driven time resolved treatment of correlation data. *Scientific Reports*, *9*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-019-50077-4

Mathieu, M., Petitpas, I., Navaza, J., Lepault, J., Kohli, E., Pothier, P., Prasad, B. V. V., Cohen, J., & Rey, F. A. (2001). Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: Implications for the architecture of the virion. *EMBO Journal*, *20*(7), 1485–1497. https://doi.org/10.1093/emboj/20.7.1485

Mena, J. A., Ramírez, O. T., & Palomares, L. A. (2003). Titration of non-occluded baculovirus using a cell viability assay. *BioTechniques*, *34*(2), 260–264. https://doi.org/10.2144/03342bm05

Mena, J. A., Ramírez, O. T., & Palomares, L. A. (2006). Intracellular distribution of rotavirus structural proteins and virus-like particles expressed in the insect cell-baculovirus system. *Journal of Biotechnology*, *122*(4). https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.10.005

O'Reilly, K. M., & A, L. V. (1994). Baculovirus expression vectors: a laboratory manual. *Oxford University Press*, 3–29.

O'Rourke, J. P., Daly, S. M., Triplett, K. D., Peabody, D., Chackerian, B., & Hall, P. R. (2014). Development of a mimotope vaccine targeting the Staphylococcus aureus quorum sensing pathway. *PLoS ONE*, *9*(11). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111198

Palomares, L. A., López, S., & Ramírez, O. T. (2002). Strategies for manipulating the relative concentration of recombinant rotavirus structural proteins during simultaneous production by insect cells. *Biotechnology and Bioengineering*, *78*(6). https://doi.org/10.1002/bit.10243

Palomares, L. A., Mena, J. A., & Ramírez, O. T. (2012). Simultaneous expression of recombinant proteins in the insect cell-baculovirus system: Production of virus-like particles. *Methods*, *56*(3), 389–395. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.01.004

Palomares, L. A., & Ramírez, O. T. (2001). El sistema de células de insecto-baculovirus una alternativa poderosa para la producción de pseudo-partículas virales y otras proteínas recombinantes. *BioTecnología*, *6*(2).

Palomares, L. A., & Ramírez, O. T. (2009). Challenges for the production of virus-like particles in insect cells: The case of rotavirus-like particles. In *Biochemical Engineering Journal* (Vol. 45, Issue 3, pp. 158–167). https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.02.006

Palomares, L. A., Realpe, M., & Ramírez, O. T. (2015). *An Overview of Cell Culture Engineering for the Insect Cell-Baculovirus Expression Vector System (BEVS)* (pp. 501–519). https://doi.org/10.1007/978-3-319-10320-4_15

Palomares, L., Estrada-Mondaca, S., & Ramirez, O. (2006). Principles and applications of the insect-cell-baculovirus expression vector system. *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cellular Therapies*.

Pan, X. X., Zhao, B. X., Teng, Y. M., Xia, W. Y., Wang, J., Li, X. F., Liao, G. Y., Yang, C., & Chen, Y. D. (2016). Immunoreactivity of chimeric proteins carrying poliovirus epitopes on the VP6 of rotavirus as a vector. *Molecular Biology*, *50*(5), 731–739. https://doi.org/10.1134/S0026893316030092

Peralta, A., Molinari, P., & Taboga, O. (2009). Chimeric recombinant rotavirus-like particles as a vehicle for the display of heterologous epitopes. *Virology Journal*, *6*. https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-192

Plascencia-Villa, G., Mena, J. A., Castro-Acosta, R. M., Fabián, J. C., Ramírez, O. T., & Palomares, L. A. (2011). Strategies for the purification and characterization of protein scaffolds for the production of hybrid nanobiomaterials. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *879*(15–16), 1105–1111. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.03.027

Plascencia-Villa, G., Saniger, J. M., Ascencio, J. A., Palomares, L. A., & Ramírez, O. T. (2009). Use of recombinant rotavirus VP6 nanotubes as a multifunctional template for the synthesis of nanobiomaterials functionalized with metals. *Biotechnology and Bioengineering*, *104*(5), 871–881. https://doi.org/10.1002/bit.22497

Rebelo, B. A., Folgado, A., Ferreira, A. C., & Abranches, R. (2022). Production of the SARS-CoV-2 Spike protein and its Receptor Binding Domain in plant cell

suspension cultures. *Frontiers in Plant Science*, *13*. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.995429

Redmond, M., Bielefeldt Ohaman, H., Huges, H. P. A., Sabara, M., Frenchick, P. J., Attah Poku, S. K., Ijaz, M. K., Parker, M. D., Laarvelds, B., & Babiuk, L. A. (1991). Rotavirus particles function as immunological carriers for the delivery of peptides from infectious agents and endogenous proteins. In *Molecular Immunology* (Vol. 28, Issue 3).

Ríos de Anda, B. Ioatzin. (2012). *ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS Y POLIMORFISMO DE VP6 DE ROTAVIRUS MEDIANTE ULTRASONICACIÓN*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Rivas, M. A. (2013). *Evaluación de medios de cultivo para la producción de una vacuna recombinante contra Rotavirus.* Universidad Politécnica del Estado de Morelos.

Rodríguez, M., Castro-Acosta, R. M., Ruiz-Morales, E. R., Villanueva-Flores, F., Ramírez, O. T., & Palomares, L. A. (2021). A novel method for the in vitro assembly of virus-like particles and multimeric proteins. *Biotechnology Letters*, *43*(6), 1155–1161. https://doi.org/10.1007/s10529-021-03093-2

Rodríguez, M., Wood, C., Sanchez-López, R., Castro-Acosta, R. M., Ramírez, O. T., & Palomares, L. A. (2014). Understanding internalization of rotavirus VP6 nanotubes by cells: Towards a recombinant vaccine. *Archives of Virology*, *159*(5). https://doi.org/10.1007/s00705-013-1916-z

Rodríguez-Galván, A., Heredia, A., Plascencia-Villa, G., Ramírez, O. T., Palomares, L. A., & Basiuk, V. A. (2008). Scanning tunneling microscopy of rotavirus VP6 protein self-assembled into nanotubes and nanospheres. *Journal of Scanning Probe Microscopy*, *3*(1–2), 25–31. https://doi.org/10.1166/jspm.2008.004

Rohrmann, G. (2013). The baculovirus replication cycle : Effects on cells and insects. *Baculovirus Molecular Biology*, *Figure 3*.

Ruffing, M., Zentgraf, H., & Kleinschmidt, J. A. (1992). Assembly of viruslike particles by recombinant structural proteins of adeno-associated virus type 2 in insect cells. *J Virol* , *66*(12), 6922–6930.

Schwarz, B., Uchida, M., & Douglas, T. (2017). Biomedical and Catalytic Opportunities of Virus-Like Particles in Nanotechnology. In *Advances in Virus Research* (Vol. 97, pp. 1–60). Academic Press Inc. https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.09.002

Scinto, S. L., Bilodeau, D. A., Hincapie, R., Lee, W., Nguyen, S. S., Xu, M., am Ende, C. W., Finn, M. G., Lang, K., Lin, Q., Pezacki, J. P., Prescher, J. A., Robillard, M. S., & Fox, J. M. (2021). Bioorthogonal chemistry. In *Nature Reviews Methods Primers* (Vol. 1, Issue 1). Springer Nature. https://doi.org/10.1038/s43586-021-00028-z

Shoja, Z., Jalilvand, S., Latifi, T., & Roohvand, F. (2022). Rotavirus VP6: involvement in immunogenicity, adjuvant activity, and use as a vector for heterologous peptides, drug delivery, and production of nano-biomaterials. In *Archives of Virology* (Vol. 167, Issue 4, pp. 1013–1023). Springer. https://doi.org/10.1007/s00705-022-05407-9

Stetefeld, J., McKenna, S. A., & Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. In *Biophysical Reviews* (Vol. 8, Issue 4, pp. 409–427). Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6

Tamminen, K., Heinimäki, S., Gröhn, S., & Blazevic, V. (2020). Internalization and antigen presentation by mouse dendritic cells of rotavirus VP6 preparations differing in nanostructure. *Molecular Immunology*, *123*, 26–31. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.04.001

Tamminen, K., Heinimäki, S., Gröhn, S., & Blazevic, V. (2021). Fusion protein of rotavirus VP6 and SARS-CoV-2 receptor binding domain induces T cell responses. *Vaccines*, *9*(7). https://doi.org/10.3390/vaccines9070733

Thermo Scientific. (2012). *Crosslinking Technical Handbook*.

Urabe, M., Ding, C., & Koltin, R. M. (2002). Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum Gen Ther*, *13*(16), 1935–1943.

Vaidya, A. J., & Solomon, K. V. (2022). Surface Functionalization of Rod-Shaped Viral Particles for Biomedical Applications. In *ACS Applied Bio Materials* (Vol. 5, Issue 5, pp. 1980–1989). American Chemical Society. https://doi.org/10.1021/acsabm.1c01204

Wang, D., Mai, J., Zhou, W., Yu, W., Zhan, Y., Wang, N., Epstein, N. D., & Yang, Y. (2020). Immunoinformatic analysis of T-and B-cell epitopes for SARS-CoV-2 vaccine design. *Vaccines*, *8*(3), 1–15. https://doi.org/10.3390/vaccines8030355

Waters. (2025). *Understanding Dynamic Light Scattering*. Wyatt Technology.

10.- ANEXOS

10.1.- Condiciones previamente reportadas sobre la producción de NTVP6

Tabla A1. Condiciones reportadas para la producción de NTVP6

Tipo celular	Medio	Densidad celular inicial (cel/mL)	MDI (UFP/cel)	Rendimiento (mg/L)*	Referencia
Hi-5	ExCell 405, Express Five	0.5×10^6	0.1	-	Rodríguez et al., 2014
Hi-5	SF900 II	0.5×10^6	0.1	-	Plascencia-Villa et al., 2011
Hi-5	PSFM	1×10^6	0.5	2.28	Liñan, 2019
Hi-5	Express Five	1×10^6	1.0	16.8	Rivas et al., 2013
Hi-5	ExCell	1×10^6	1.0	5.4	
Hi-5	PSFM	1×10^6	1.0	6.2	
Hi-5	SF900 II	1×10^6	1.0	0.14	
Hi-5	Ex-Cell	1×10^6	1.0	5	Ríos de Anda, 2012

* Este rendimiento corresponde a la cuantificación de proteína total obtenida posterior a la cromatografía de exclusión molecular

10.2.- Comparación entre secuencias NCDV y SA11

```
SA11 MDVLYSLSKTLKDARDKIVEGTLYSNVSDLIQQFNQMIITMNGNEFQTGGIGNLPIRNWNFNFGLLG
NCDV MDVLYSLSKTLKDARDKIVEGTLYSNVSDLIQQFNQMIITMNGNEFQTGGIGNLPIRNWNFDFGLLG
SA11 TTLLNLDANYVETARNTIDYFVDFVDNVCMDEMVRESQRNGIAPQSDSLRKLSAIKFKRINFDNSSE
NCDV TTLLNLDANYVETARNTIDYFVDFVDNVCMDEMVRESQRNGIAPQSDSLRKLSGLKFKRINFDNSSE
SA11 YIENWNLQNRRQRTGFTFHKPNIFPYSASFTLNRSQPAHDNLMGTMWLNAGSEIQVAGFDYSCAINA
NCDV YIENWNLQNRRQRTGFTFHKPNIFPYSASFTLNRSQPAHDNLMGTMWLNAGSEIQVAGFDYSCAINA
SA11 PANIQQFEHIVPLRRVLTTATITLLPDAERFSFPRVINSADGATTWFFNPVILRPNNVEVEFLLNGQ
NCDV PANTQQFEHIVQLRRVLTTATITLLPDAERFSFPRVINSADGATTWYFNPVILRPNNVEVEFLLNGQ
SA11 IINTYQARFGTIVARNFDTIRLSFQLMRPPNMTPAVAVLFPNAQPFEHHATVGLTLRIESAVCESVL
NCDV IINTYQARFGTIIARNFDTIRLSFQLMRPPNMTPAVAALFPNAQPFEHHATVGLTLRIESAVCESVL
SA11 ADASETLLANVTSVRQEYAIPVGPVFPPGMNWTDLITNYSPSREDNLQRVFTVASIRSMLIK
NCDV ADASETMLANVTSVRQEYAIPVGPVFPPGMNWTDLITNYSPSREDNLQRVFTVASIRSMLVK
```

Se remarcan en grises los residuos con diferentes aminoácidos.

10.3.- Secuencia de gen VP6

atggatgtcctatactctttgtcaaagactcttaaagacgctagagacaaaattgtcgaaggcaca
ttgtattctaacgtgagtgatctaattcaacaatttaatcaaatgataattactatgaatggaaat
gaatttcaaactggaggaatcggtaatttgccaattagaaactggaattttaatttcgggttactt
ggaacaactttgctgaacttagacgctaattatgttgaaacggcaagaaatacaattgattatttc
gtggattttgtagacaatgtatgcatggatgagatggttagagaatcacaaaggaacggaattgca
cctcaatcagactcgctaagaaagctgtcagccattaaattcaaaagaataaattttgataattcg
tcggaatacatagaaaactggaatttgcaaaatagaagacagaggacaggtttcacttttcataaa
ccaaacatttttccttattcagcatcatttacactaaatagatcacaacccgctcatgataatttg
atgggcacaatgtggttaaacgcaggatcggaaattcaagtcgctggatttgactactcatgtgct
attaacgcaccagccaatatacaacaatttgagcatattgtgccactccgaagagtgttaactaca
gctacgataactcttctaccagacgcggaaaggtttagttttccaagagtgatcaattcagctgac
ggggcaactacatggtttttcaacccagtgattctcaggccgaataacgttgaagtggagtttcta
ttgaatggacagataataaacacttatcaagcaagatttggaactatcgtagctagaaattttgat
actattagactatcattccagttaatgagaccaccaaacatgacaccagcagtagcagtactattc
ccgaatgcacagccattcgaacatcatgcaacagtgggattgacacttagaattgagtctgcagtt
tgtgagtctgtactcgccgatgcaagtgaaactctattagcaaatgtaacatccgttaggcaagag
tacgcaataccagttggaccagtctttccaccaggtatgaactggactgatttaatcaccaattat
tcaccgtctagggaggacaatttgcaacgcgtatttacagtggcttccattagaagcatgctcatt
aaatga

10.4.- Secuencia del plásmido pJET1.2-RBS_VP6

tcacacaggaaagtactagatggatgtcctatactctttgtcaaagactcttaaagacgctagagacaaaatt
gtcgaaggcacattgtattctaacgtgagtgatctaattcaacaatttaatcaaatgataattactatgaatg
gaaatgaatttcaaactggaggaatcggtaatttgccaattagaaactggaattttaatttcgggttacttgg
aacaactttgctgaacttagacgctaattatgttgaaacggcaagaaatacaattgattatttcgtggatttt
gtagacaatgtatgcatggatgagatggttagagaatcacaaaggaacggaattgcacctcaatcagactcgc
taagaaagctgtcagccattaaattcaaaagaataaattttgataattcgtcggaatacatagaaaactggaa
tttgcaaaatagaagacagaggacaggtttcacttttcataaaccaaacatttttccttattcagcatcattt
acactaaatagatcacaacccgctcatgataatttgatgggcacaatgtggttaaacgcaggatcggaaattc
aagtcgctggatttgactactcatgtgctattaacgcaccagccaatatacaacaatttgagcatattgtgcc
actccgaagagtgttaactacagctacgataactcttctaccagacgcggaaaggtttagttttccaagagtg
atcaattcagctgacggggcaactacatggtttttcaacccagtgattctcaggccgaataacgttgaagtgg
agtttctattgaatggacagataataaacacttatcaagcaagatttggaactatcgtagctagaaattttga
tactattagactatcattccagttaatgagaccaccaaacatgacaccagcagtagcagtactattcccgaat
gcacagccattcgaacatcatgcaacagtgggattgacacttagaattgagtctgcagtttgtgagtctgtac
tcgccgatgcaagtgaaactctattagcaaatgtaacatccgttaggcaagagtacgcaataccagttggacc
agtctttccaccaggtatgaactggactgatttaatcaccaattattcaccgtctagggaggacaatttgcaa
cgcgtatttacagtggcttccattagaagcatgctcattaaatga

10.5.- Plásmido pSB1T3-VP6

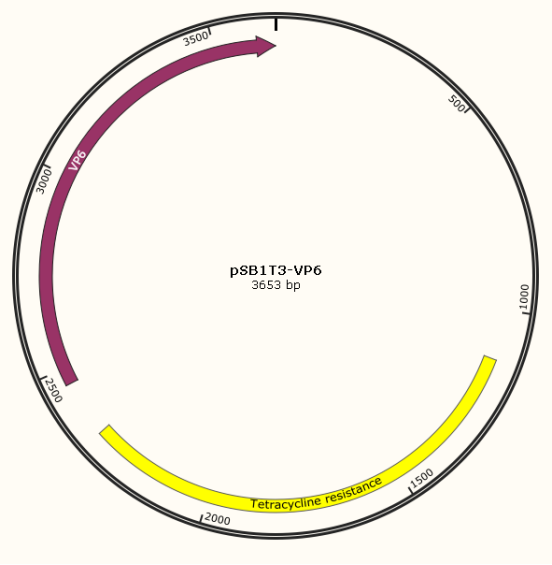


Figura A1. Plásmido pSB1T3-VP6

10.6.- Caracterización de NTVP6 (c+)

Se caracterizaron *stock*s de NTVP6 a través de SDS-PAGE para contar con un C+. Se comprobó la pureza de estos al utilizar tinción con azul de Coomassie (Figura A2 A) y se identificó la presencia de VP6 mediante WB (Figura A2 B), dando como resultado que la mayor presencia de VP6 se encuentra en los NTVP6_2. Esta muestra junto con los NTVP6 producidos fueron analizados por microscopía electrónica de transmisión para la comprobación de la presencia de nanotubos (Figura A2 C y A2 D).

Se logra apreciar que los NTVP6 que se han mantenido guardados durante aproximadamente 6 años mantienen una forma tubular; sin embargo no se encuentran en óptimas condiciones, pues no se aprecia de forma definida el patrón cuasihexagonal característico en su superficie.

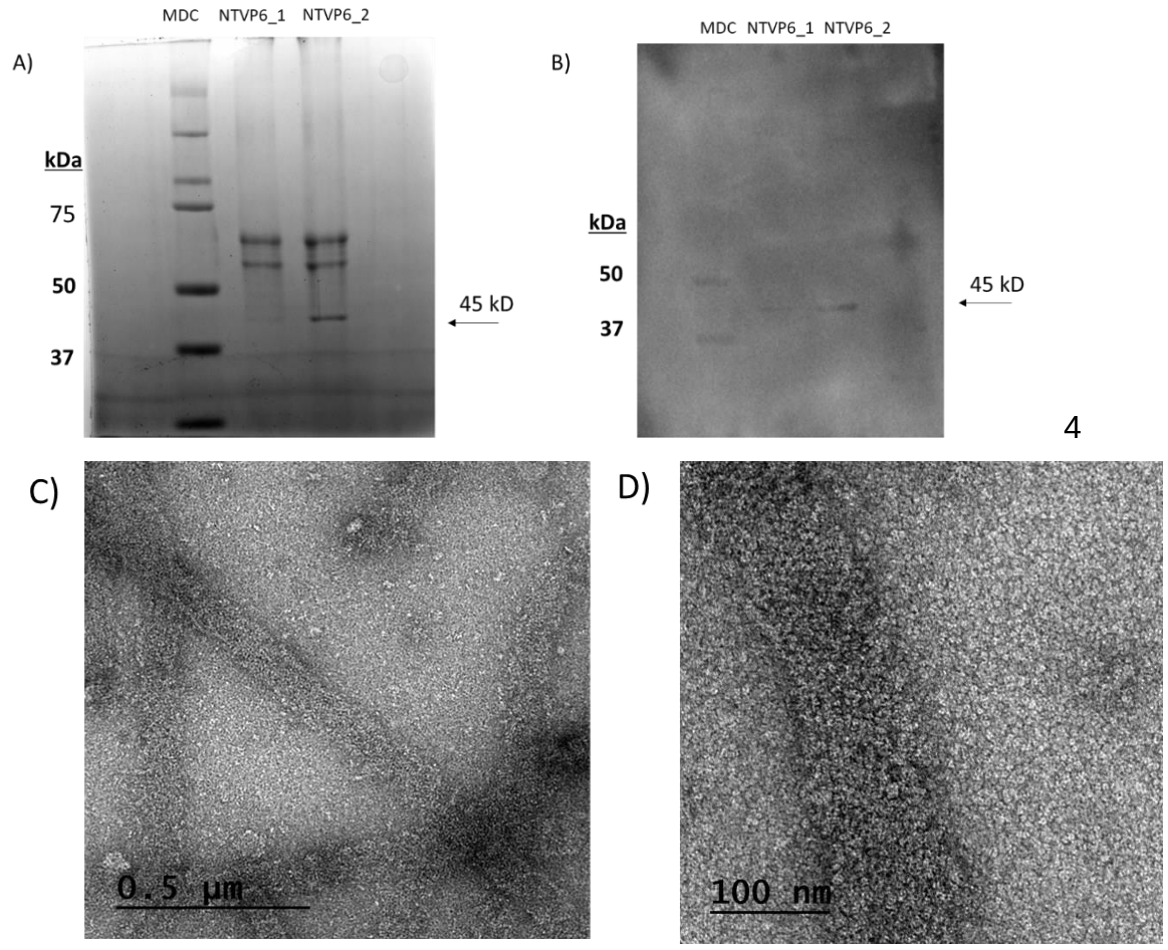


Figura A2. Caracterización de muestras de NTVP6 del 2018 (Facilitados por Arturo Liñan). A) Tinción de azul de Coomassie. B) WB utilizando anticuerpos para detectar VP6, en ambas muestras de NTVP6 de 2018; NTVP6_1 y NTVP6_2. C) micrografía de NTVP6_2 obtenidos por TEM aumento 16,000x. D) micrografía de NTVP6 obtenida por TEM aumento a 50,000x.

10.7.- Resultados de análisis de pellet

Así como en la sección 6.1.4 fue evaluado el sobrenadante obtenido del proceso de optimización, también fue evaluada la producción de VP6 en el pellet en la muestra, obteniendo los resultados de la figura A3. De cada tratamiento se seleccionaron los tiempos más productores para posteriormente compararlos (Figura A3 D).

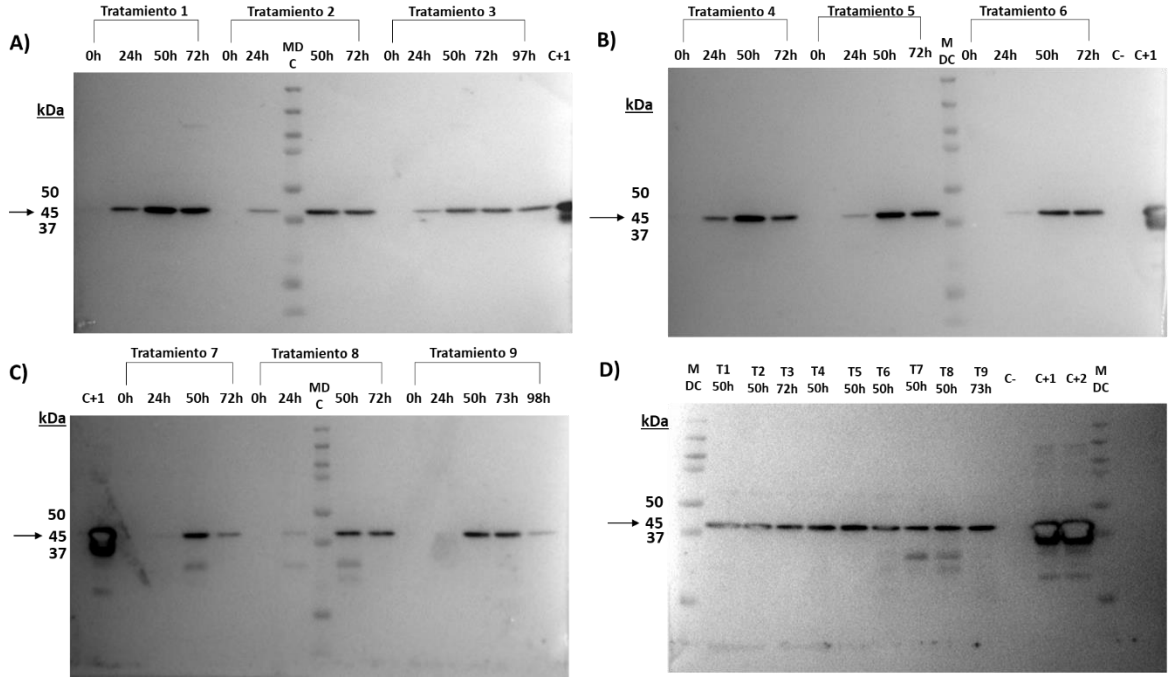


Figura A3. WB de pellet colectado en cinética para optimización de producción VP6. MDC; marcador dual color, C+1;700 ng y C+2; 1000 ng de NTVP6. A-C) Evaluación de la producción de VP6 cada 24 h para los diversos tratamientos. D) Comparación entre tiempos más productores de VP6.

A diferencia de las muestras obtenidas en el sobrenadante, la mayor concentración de VP6 para el pellet se observa 24 h antes de la última toma. Esto representa las 50 hpi para el T1, T2, T4, T5,T6,T7 y T8, mientras que para los T3 y T9 se presenta una mayor producción a las 72 hpi. Al realizar una comparación entre las intensidades de banda se obtuvo que la banda con mayor cantidad relativa es la

correspondiente a una densidad celular inicial de 2 x 10^6 cel/mL con una MDI de 2.5 UFP/cel (tratamiento 5) a las 50 hpi.

10.8.- Segunda producción de NTVP6

Las muestras de la figura A4 se tomaron durante la purificación de la segunda producción. Estas muestras fueron el sobrenadante clarificado (clarif), el cual se filtró con filtros de 0.22 μm (fil), posteriormente el clarificado filtrado fue inyectado a la columna de la cromatografía de intercambio aniónico. Durante la purificación por CIA se realizó una toma de muestras cada 3 volúmenes de columna a partir de la aparición del primer pico 1 y hasta que la absorbancia tuvo un valor de cero (T1-T9). Las muestras T1-T5 se mezclaron obteniendo la muestra F1 y de T6-T9 se mezcló en F2. A partir de estas muestras se analizó por WB la presencia de VP6 (A.5A) y la presencia de GP64(A.5B).

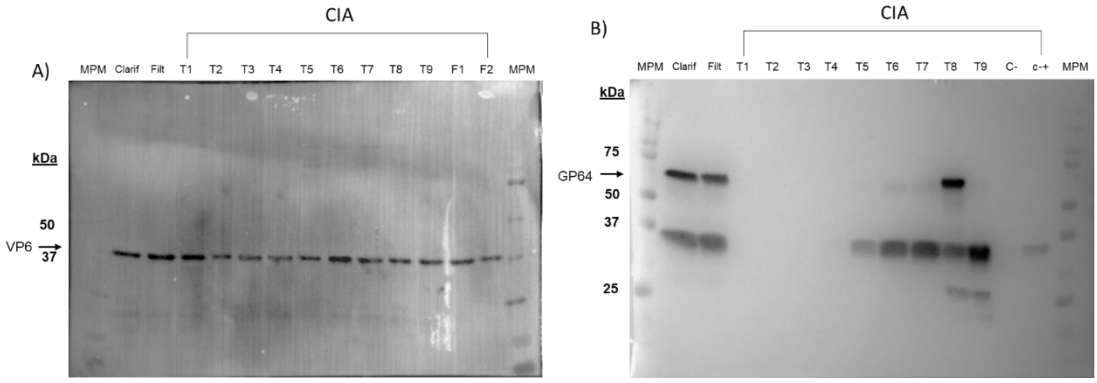


Figura A4. Análisis del proceso de purificación de la segunda producción. A y B) WB anti VP6, C y D) WB anti GP64.

Al analizar el proceso de purificación se logró observar la presencia de la proteína GP64 desde la T5. Esto indica de los 396 mL anteriormente inyectados no saturan la columna con el contaminante, por lo tanto, si se busca realizar una purificación de NTVP6 con el medio PSFM y las células *Sf9* es recomendable inyectar en la columna una cantidad de sobrenadante clarificado menor a esta.

10.9.- Tercera producción de NTVP6

Las muestras obtenidas del proceso de purificación fueron analizadas WB y geles con tinción de azul de Coomassie (Figura A5). El análisis por WB nos permitió observar la presencia de GP64 (Figuras A5 A y A5 D) y la presencia de VP6 (A5 B y A5 E). Las muestra positivas utilizadas para A5 A y A5 D es proteína GP64, mientras que para A6-B,C,E,F el control positivo utilizado son NTVP6 del 2018.

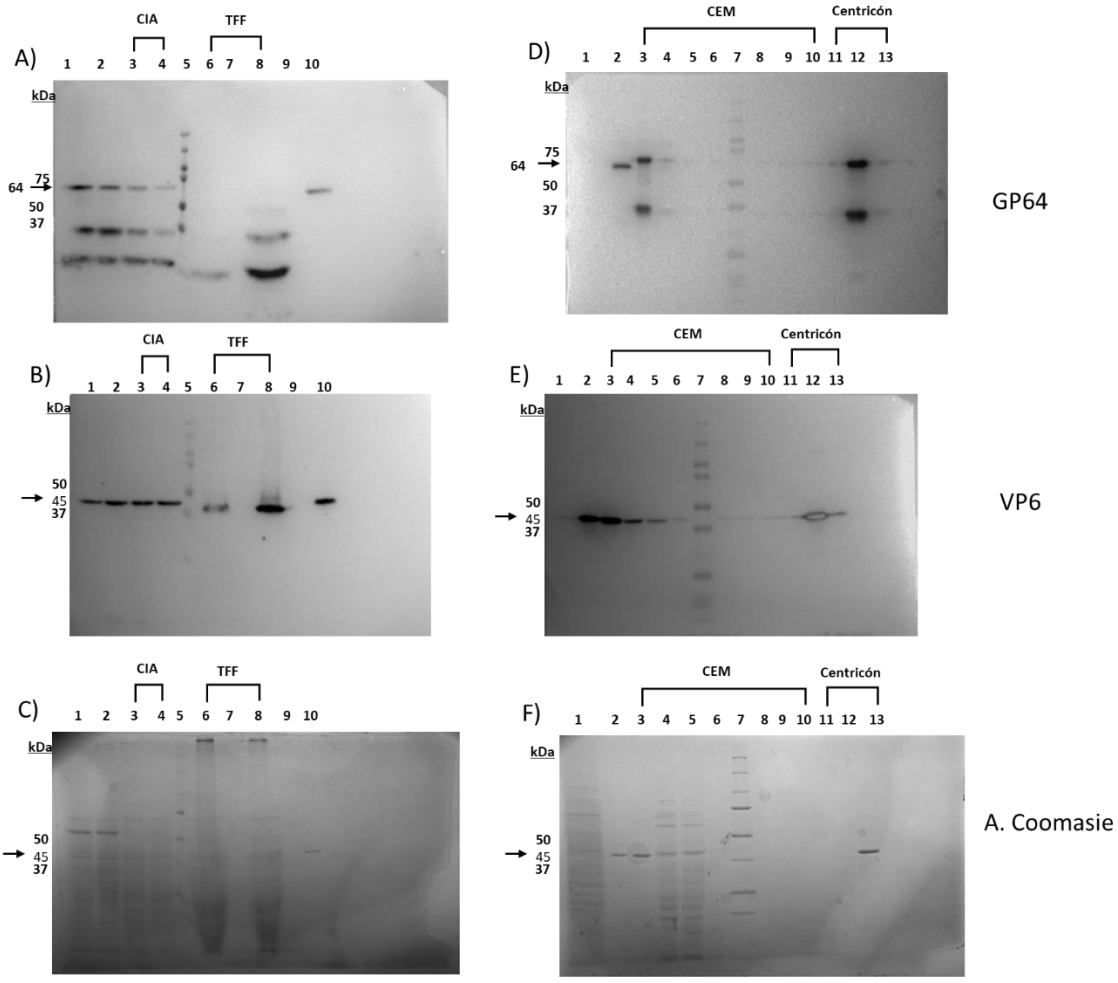


Figura A5. Análisis de muestras obtenidas en proceso de purificación. A y D) WB GP64. ByE) WB VP6. CyF) SDS-PAGE con tinción de azul de coomasie. **Las muestras fueron de A-C;** 1)sobrenadante clarificado, 2)clarificado filtrado, 3)P1 de CIA, 4)P3 de CIA , 5)MPM, 6)Concentrado de TFF, 7)Permeado de TFF, 8)Concentrado de TFF filtrado por 0.45 µm, 9) sobrenadante de células Sf9 (C-), 10) muestras positivas para cada caso. **Las muestras de D-F;** 1)C-, 2)C+ para cada caso, 3)P1 CEM, 4)P2.1 CEM, 5)P2.2 CEM, 6)P2.3 CEM, 7)Marcador Dual Color, 8)P2.4 CEM, 9)P2.5 CEM, 10)P3 CEM, 11)Flow Through centricón, 12)Concentrado de centricón, 13)Concentrado de centricón filtrado por 0.22 µm.

En este análisis se puede apreciar que la muestra se encuentra contaminada por GP64, sin embargo en el gel con tinción de azul de Coomassie la banda correspondiente a la muestra purificada (Figura A5 F carril 13) presenta una banda de mayor intensidad posicionada aproximadamente los 45 KDa, que es donde se encuentra VP6, mientras que hay una banda de mucho menor intensidad y tamaño correspondiente a GP64 (64 KDa).

Al caracterizar la muestra obtenida observó por TEM los NTVP6 no fueron observados a excepción del reportado en la figura A6 A, el cual se mostró roto y no se observó la característica forma cuasihexagonal de estos nanotubos, esto sugiere que los NTVP6 se rompieron durante el proceso de purificación; lo más probable es que al ser sometidos al proceso de filtración para mantener la esterilidad el esfuerzo mecánico para pasarlos por poros de menor tamaño que los nanotubos. Estos perdieran estabilidad y se desintegraran. A pesar de esto al analizarlos por DLS se observó un tamaño similar al esperado para los NTVP6, al tener un Rh de 889 nm (Figura A6 B).

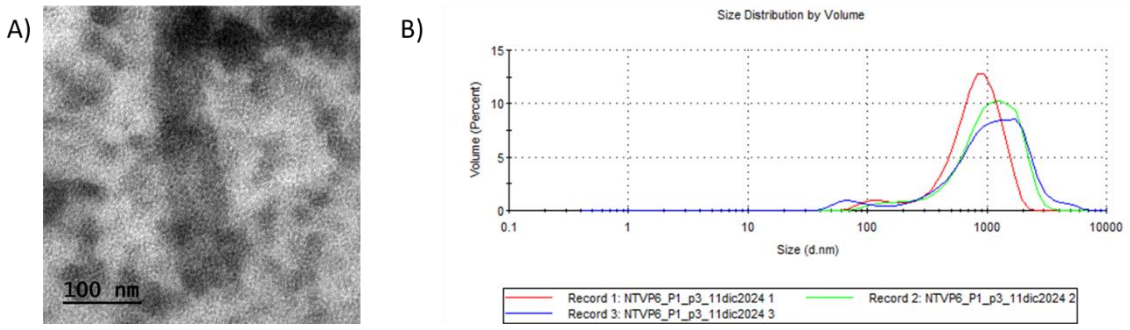


Figura A6. Caracterización de tercera producción. A) micrografía tomada por TEM aumento 50,000x. B) DLS Rh de 127 nm, y 889 nm, distribución no uniforme.

VOTOS DE APROBATORIOS

SECRETARIO EJECUTIVO
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

P R E S E N T E

Por medio del presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la **C. BARBA HERNANDEZ EDITH** con número de matrícula **10000379** cuyo título es:

Plataforma para el despliegue de péptidos en nanotubos de VP6 de rotavirus

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIATURA EN CIENCIAS AREA TERMINAL EN BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR.**

Cuernavaca, Mor a 17 de diciembre de 2025

Atentamente
Por una humanidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DRA. CARMEN NINA PASTOR COLON	**(PRESIDENTE)**
DR. FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA	**(SECRETARIO)**
M.C. ARTURO LIÑAN TORRES	**(VOCAL)**
M.C. ANA RUTH PASTOR FLORES	**(SUPLENTE)**
DR. RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE	**(SUPLENTE)**

eae

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

CARMEN NINA PASTOR COLON | Fecha:2025-12-17 09:02:29 | FIRMANTE

YBCPrdRVSas3G21um5JGEPqW0yvFAxho2GZdYZQ1pWBqREHMqn8jz3wckahBV+2zXHdMX2kyOFp7bR3qxVLEheJ/72Zwex/IghHTIFmalDXdtdHRhOneS+R8ikZM39cScV3+wNMjTwHvUTBEAA3uU5FMcKDx7q/QaZ+ObOsMTDPYZV61WCxbG+Plo8PS6dQONM0KTJ2faCCjIj0TziqIuWvCSg27X44APs06NTUvxAyGqdv06j2a+H65oOppI4WUqJKz3cUlBBX9LjI6Zsl+LLJPXQU2OwZvrL1QfcF2Yq+IbPmm+I3Eb0cAE7s6EPYGj6bm+EEwj9OoiBTs0sc4yw==

ARTURO LIÑAN TORRES | Fecha:2025-12-17 09:49:02 | FIRMANTE

jx5JKg0VJKO0YKuaRsxE3UZCVexCe4exmRyHHcBXyfSp6vpNBH9phQv037NW+3zXfttQWcy4KkcNlvY8+OSvbEJRoOHKrUBg4ieEMiOt4VIQ8BBMaBsmDwNXHdcZzkDhR6FCYVeh7avfDCQOwYgeN5Rdo2McWamwBnjdyHNGEcWJNxW9oOuADHTnuReLVR3eHfkozlj5c1otr4ld8VswwGyaorJz/3OjyqIJS1qf4lnD0RYPQX6gkNkt43qmcm9dcFLWkNnjkdTIMXD1MOOBjl15P0W/jx4KO/eY5I/WBGffmiFds/tIHfS1RwEh3956wBLYT6CRzSDEi91zPg2KWQ==

FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA | Fecha:2025-12-17 14:36:30 | FIRMANTE

ofhEeqwfizvjluCCgBJsO1jVWLeEdttUO06uSPoKZPxOvNd7wGq6soYWZ5y3HzJL4yuQf4hxti7XY8F6JoKHJY+n3HJMqJhCXvBnD2Y+30dXPJwCrzkm5DVjdgFgs06gcUKWhiBAFoET94NIzTbusnvZ86YtB93JMUZCbO05eRDw1Ip/MGzjlltaED+w1VuMFnsvnUvzXOsXy/YVWRL+2GamR4xg2hwg2SEVsNycFYwUnOLnHgNJz3WoqKpyeme4U1ZNjuwiGsm0EFHrOMC3TsCAIYodU7LWRJaJsWXfmw2Ccw/GeWbAkpnglsCIMX+HPYLw0omYbEy22EsZ1Fmmow==

RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE | Fecha:2025-12-17 15:44:02 | FIRMANTE

qR56yWjpatmJ9t9Qi6aOld+aRzUWZpF8UjbME9i+zz6UvvjmxaWLh5GY7Fj4oxyJSlGyu2AAWZpPoodqJJTPuxSGwfNMUoFOao+99XiG6htfLSM8+7Rj5KGakU4g12rwIKKZS3z0p4zAUuQ4rPsm+AfFjGWOZtFaJ6RYgqBc2S4nOg2nVMrQKmXZmAL1xZeayPGTkBXsn5t54+/7ilagLxvV+OD9CtyKdrdT7WBGaI7+l0hWhHvhqVfbeo5K+KM6GW/gGUiG0TTKEYNt+le7iUzBp6+zhh5Ln/5jxC5RfuZEBFBgp+7316Sbm0R/L/k5izbQz5lwyuGO4nKi8lfgyg==

ANA RUTH PASTOR FLORES | Fecha:2025-12-18 12:05:28 | FIRMANTE

VgtmIONA5d8sNqpKKLffgc6hh4fhG3JPVZndOxzGzqrqfZYTvAUA7xMZwGifmoHjnmjcExaBgySC4HibTqYUKSYMX5G0nSjKYJ16S8ENE+QwP+eA7sJT5dJsrJ87NmBPeBvIVrAUK50tKYS1UvYjmuC5+ZXiDqn9XhI142HyYfwbg/bN4hCXWaCo5Z/ulEDX1q1xVTRza+j2mHSH6RA76aqMX9pFG99zjbGloaCwPBHMvDNfKhHCTy5yIs5ZTnPGx/GPrq0SlPs3igEdASLa+r6ho2KxPam8W2joFLyKwd5Crzx+M43C3vG/O6WrHdG3hrfS3iBF3DQSWJFrCmYC4Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

FrUJmdOin

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/36xFEPmty7HdF5pCHwW540f536r6cQh4