



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PROPIEDADES INMUNOLÓGICAS DE
NANOPARTÍCULAS GENÉTICAMENTE CODIFICADAS COMO ACARREADORES
DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

ADOLFO CRUZ RESÉNDIZ

TUTOR:

**LUIS ALFONSO VACA DOMÍNGUEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM**

COMITÉ TUTOR:

**ALICIA SAMPIERI GARCÍA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM
JOSÉ IVÁN SÁNCHEZ BETANCOURT
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX. ENERO DE 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatorias

A mi familia, especialmente a mi mamá Eusebia por su amor, cariño y apoyo, a mi papá Leopoldo por motivarme a seguir mis estudios, a mis hermanos Silvia y Leopoldo por su ejemplo y consejos, y a mis sobrinos Juan Pablo, Sofía y Santiago por sus travesuras y sonrisas.

A mis amigos casi hermanos que desde siempre me han mostrado su cariño y apoyo, Lili, Luz, Andrea, Emmanuel, Enrique, Miguel, Mónica, Karina, Raquel, Laura, Iván, Arlette, Karla, Margarita, Carlos y Kevin.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Instituto de Fisiología Celular, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y al programa de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, por darme la oportunidad de seguir creciendo académicamente.

A mi tutor Dr. Luis A. Vaca Domínguez por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por el proyecto que bajo su tutoría se logró con éxito, por todos sus consejos, recomendaciones, correcciones y por su apoyo para mi formación.

A mi comité tutor: La Dra. Alicia Sampieri García y el Dr. J. Iván Sánchez Betancourt por su enorme apoyo, conocimiento y contribuciones para este trabajo de investigación.

Al jurado de examen de grado: Dra. Edda Lydia Sciutto Conde, Dr. Luis A. Vaca Domínguez, Dra. Goar Gevorkian Markosian, Dra. Alicia Sampieri García y Dr. Armando Hernández García por sus observaciones, recomendaciones y conocimientos.

Al Lab. 126 norte del Instituto de Fisiología Celular, especialmente a Salustia Ángela Salgado que además de su apoyo como asistente de laboratorio nos cuida como a sus hijos.

Al Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo (LABNALCIT, UNAM) y a los laboratorios de Imagenología y de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular (IFC, UNAM) por el apoyo y las facilidades para realizar experimentos.

Al Bioterio (IFC, UNAM) por criar, alimentar, cuidar y darnos todos los ratones que necesitamos para el desarrollo de proyecto y también a los ratones que sin ellos no hubiera sido posible obtener los resultados que se obtuvieron.

Agradecimientos especiales

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por su apoyo en los trabajos de investigación (AN200920, Diseño de una vacuna de última generación para coronavirus).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por darme la oportunidad de pertenecer al programa de becas CONACYT y poder seguir con mi formación profesional (CVU 666107).

A la fundación COMEXUS - Fulbright-García Robles por su apoyo en el programa de investigación.

A laboratorios Sanfer® por su apoyo económico para la realización de algunos objetivos del proyecto.

Índice

Dedicatorias	I
Agradecimientos	II
Agradecimientos especiales	III
Índice.....	IV
Lista de cuadros.....	VII
Lista de figuras.....	VIII
Resumen.....	IX
Abstract	X
1. Introducción	1
1.1 Evolución de las vacunas.....	1
1.2 Tipos de vacunas y sus características.....	3
1.3 Adyuvantes.....	6
1.4 Desarrollo de vacunas de nueva generación.....	7
1.5 Biomateriales.....	8
1.6 Baculovirus y su ciclo de vida.....	10
1.6.1 Poliedras y poliedrina	11
2. Antecedentes	13
3. Justificación.....	15
4. Hipótesis.....	17
5. Objetivos	18
5.1 Objetivo general	18
5.2 Objetivos específicos.....	18
6. Materiales y métodos	19
6.1 Generación de baculovirus recombinantes.....	19
6.2 Cultivo celular y propagación de baculovirus	19
6.3 Purificación de NPs PH ₍₁₋₁₁₀₎ GFP.....	19
6.3.1 Purificación por centrifugación	19
6.3.2 Cuantificación de NPs PH ₍₁₋₁₁₀₎ GFP	20
6.3.3 Electroforesis de proteína	20
6.3.4 Identificación de las proteínas por Western blot	20

6.3.5	Evaluación de pureza e integridad de las nanopartículas	21
6.4	Caracterización morfológica de las partículas PH ₍₁₋₁₁₀₎ GFP	21
6.4.1	Microscopía confocal de células infectadas.....	21
6.4.2	Microscopía electrónica de transmisión (TEM, Transmission Electron Microscopy) en células	22
6.4.3	Microscopía electrónica de barrido (SEM, Scanning Electron Microscope) de nanopartículas purificadas	22
6.4.4	Determinación de tamaños por análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA, Nanoparticle tracking analysis)	22
6.4.5	Experimentos de recuperación de la fluorescencia después de fotoblanqueo (FRAP, Fluorescence recovery after photobleaching) de NPs PH ₍₁₋₁₁₀₎ GFP.....	23
6.5	Animales de experimentación	23
6.6	Inmunización y toma de muestras	24
6.7	Dosis respuesta	24
6.8	Evaluación del efecto adyuvante	24
6.8.1	Evaluación de memoria inmunológica generada por las partículas PH ₍₁₋₁₁₀₎ GFP	25
6.8.2	Tipo de respuesta inmune: TH1/TH2	25
6.9	Evaluación de la respuesta celular.....	25
6.9.1	Inmunización de ratones	25
6.9.2	Ensayo de linfoproliferación.....	26
6.9.3	Citometría de flujo	26
6.10	Evaluación de la termoestabilidad de PH ₍₁₋₁₁₀₎ GFP.....	27
6.11	Experimentos con partículas de diferentes tamaños.....	27
6.11.1	Separación de NPs PH ₍₁₋₁₁₀₎ GFP por gradientes de sacarosa.....	27
6.11.2	Microscopía confocal de NPs	27
6.11.3	Respuesta inmune inducida por partículas PH ₁₋₁₁₀ GFP de diferentes tamaños	28
6.12	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA).....	28
6.13	Análisis estadístico	29
7.	Resultados	30
7.1	Expresión de la proteína de fusión PH ₍₁₋₁₁₀₎ GFP de 42 kDa	30
7.2	Purificación de las nanopartículas por centrifugación.....	30

7.3	La fusión de GFP a la poliedrina (PH ₍₁₋₁₁₀₎) resulta en la formación de partículas..	31
7.4	Una segunda inmunización con NPs PH ₍₁₋₁₁₀₎ GFP mejora la respuesta de anticuerpos	35
7.5	Las NPs PH ₍₁₋₁₁₀₎ GFP muestran el mismo efecto adyuvante que el hidróxido de aluminio (alum)	36
7.6	La inmunización con NPs PH ₍₁₋₁₁₀₎ GFP responde al desafío contra GFP	38
7.7	Las NPs PH ₍₁₋₁₁₀₎ GFP estimulan respuesta celular de linfocitos T	40
7.8	Las NPs PH ₍₁₋₁₁₀₎ GFP son estables a temperatura ambiente	43
7.9	El tamaño de las partículas PH ₍₁₋₁₁₀₎ GFP no modifica la respuesta inmune.....	45
8.	Discusión.....	47
9.	Conclusión	53
10.	Perspectivas.....	54
11.	Abreviaturas y siglas	55
12.	Referencias.....	58
13.	Anexos	70
13.1	Artículos publicados.....	70

Lista de cuadros

Cuadro 1. Esquema del desarrollo de vacunas humanas..... 2

Lista de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de los baculovirus.....	11
Figura 2. Representación de la estructura del cristal de poliedrina y formación de la poliedra de núcleopoliedrovirus.....	12
Figura 3. Expresión de la proteína de fusión PH ₍₁₋₁₁₀₎ GFP en un sistema de baculovirus...	30
Figura 4. Evaluación de la pureza de NPs PH ₍₁₋₁₁₀₎ GFP obtenidas por centrifugación	31
Figura 5. Caracterización morfológica de las partículas PH ₍₁₋₁₁₀₎ GFP	32
Figura 6. Determinación del tamaño de partículas formadas por la expresión de PH ₍₁₋₁₁₀₎ GFP	33
Figura 7. Recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo (FRAP) en NPs PH ₍₁₋₁₁₀₎ GFP y PH-WT-GFP	34
Figura 8. Comparación de la respuesta de anticuerpos de NPs PH ₍₁₋₁₁₀₎ GFP en concentraciones y dosis diferentes	35
Figura 9. Comparación de la respuesta de anticuerpos producida por NPs PH ₍₁₋₁₁₀₎ GFP y GFP soluble.....	36
Figura 10. Titulación de anticuerpos producidos por NPs PH ₍₁₋₁₁₀₎ GFP y GFP con y sin adyuvante	38
Figura 11. Experimento tipo desafío contra GFP en ratones	40
Figura 12. Respuesta humoral y celular determinada por el perfil de inmunoglobulinas. ..	41
Figura 13. Inducción de la proliferación de linfocitos T.....	43
Figura 14. Termoestabilidad de NPs PH ₍₁₋₁₁₀₎ GFP en diversas condiciones de temperatura	44
Figura 15. Respuesta de anticuerpos por partículas PH ₍₁₋₁₁₀₎ GFP de diferente tamaños	46

Resumen

En los últimos años, los biomateriales han tomado importancia en las áreas médicas, uno de los campos con mejores perspectivas es el desarrollo de vacunas. La vacunación tiene como objetivo proteger a un individuo contra agentes infecciosos al generar una respuesta inmune antes de que tenga contacto con el patógeno. Las vacunas actuales cumplen su propósito de manera adecuada, sin embargo, tienen algunas limitaciones, tales como: vida de anaquel corta, estricto manejo de la cadena fría, algunas tienen el riesgo de recuperar su virulencia y la producción puede ser costosa en vacunas recombinantes. Por lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar las propiedades del péptido amino terminal 1-110 aminoácidos de la poliedrina (PH₍₁₋₁₁₀₎) como biomaterial acarreador de antígenos. Esta información nos permitirá proponer este biomaterial como acarreador de antígenos para mejorar las características de las vacunas. Al péptido PH₍₁₋₁₁₀₎ se le fusionó la proteína verde fluorescente mejorada (GFP) como modelo de antígeno. En un sistema de expresión en baculovirus se obtuvieron nanopartículas (NPs) denominadas PH₍₁₋₁₁₀₎GFP. Con un sencillo proceso de lisis y centrifugación se recuperaron partículas con una pureza del 80% y con ellas se inmunizaron ratones BALB/c. Al evaluar los sueros se observaron títulos altos de anticuerpos IgG específicos a GFP incluso sin el uso de adyuvante. Seis meses después se reinmunizaron los mismos ratones con GFP soluble, los títulos de anticuerpos incrementaron, sugiriendo que las NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP generan memoria inmunológica. Linfocitos T aislados de bazo de ratones inmunizados con las NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP se proliferaron en presencia de la GFP soluble, indicando que además de respuesta humoral se produce respuesta celular. NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP deshidratadas se mantuvieron a temperatura ambiente durante un año, después de este tiempo se utilizaron para inmunizar ratones y se obtuvo la misma respuesta de anticuerpos que con nanopartículas almacenadas a -70°C durante el mismo tiempo, demostrando así la estabilidad que PH₍₁₋₁₁₀₎ confiere al antígeno fusionado a éste. En conclusión, se propone al péptido PH₍₁₋₁₁₀₎ de la poliedrina como un sistema acarreador de antígenos para la formulación de vacunas termoestables de bajo costo.

Palabras clave: vacuna, poliedrina, nanopartículas, termoestable

Abstract

In recent years, biomaterials have taken importance in medical areas, one of the fields with the best prospects is vaccine development. Vaccination aims to protect an individual against infectious agents by generating an immune response before they have contact with the pathogen. Current vaccines fulfill their purpose adequately, however, they have some limitations, such as: short shelf life, strict management of the cold chain, some have the risk of recovering their virulence and the production of recombinant vaccines can be expensive. Therefore, the present study aimed to evaluate the properties of the amino terminal peptide 1-110 amino acids of polyhedrin (PH₍₁₋₁₁₀₎) as an antigen-carrying biomaterial. This information will allow us to propose this biomaterial as an antigen carrier to improve the characteristics of vaccines. Green fluorescent protein (GFP) was fused to peptide PH₍₁₋₁₁₀₎ as a model antigen. In a baculovirus expression system, nanoparticles (NPs) named PH₍₁₋₁₁₀₎GFP were obtained. With a simple lysis and centrifugation process, particles with 80% purity were recovered and with them BALB/c mice were immunized. In the sera tested high titers of GFP-specific IgG antibodies were observed even without the use of adjuvant. 6 months later the same mice were reimmunized with soluble GFP, antibody titers increased, suggesting that the PH₍₁₋₁₁₀₎GFP NPs generate immunological memory. T lymphocytes isolated from spleens of mice immunized with the PH₍₁₋₁₁₀₎GFP NPs reacted against soluble GFP, concluding that both the humoral and cellular responses are present. Dehydrated PH₍₁₋₁₁₀₎GFP NPs were kept at room temperature for one year, after this time they were used to immunize mice and the same antibody response was obtained as with particles stored at -70 °C for the same period, demonstrating that the PH₍₁₋₁₁₀₎ peptide confers stability to the antigen. In conclusion, the polyhedrin PH₍₁₋₁₁₀₎ peptide is proposed as an antigen carrying system for the formulation of low-cost, thermostable vaccines.

Key words: vaccine, polyhedrin, nanoparticles, thermostable

1. Introducción

La vacunación ha sido uno de los avances médicos más importantes para la humanidad [1]. La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que cada año la vacunación salva de 2-3 millones de vidas [2]. Incluso, solo por detrás del agua potable, el uso de vacunas se considera como el factor más importante para la reducción de la mortalidad por infecciones y parte importante del crecimiento de la población [3].

1.1 Evolución de las vacunas

En el área de la vacunación se ha dado un constante trabajo de investigación y desarrollo, que ha llevado a la evolución de las vacunas a través de los siglos. El origen de la vacunación moderna se remonta al siglo XVIII y se le atribuye a Edward Jenner que, en el año de 1796 desarrolló la vacuna contra la viruela publicando sus resultados años después (1802) [4]. Posteriormente, surge una nueva era en la vacunación cuando Louis Pasteur de manera un tanto fortuita desarrolla la metodología para la atenuación de agentes patógenos y en el año de 1880 presenta sus resultados de la vacuna contra el cólera aviar (*Pasteurella multocida*), más adelante desarrolló la vacuna contra la rabia con la cual obtuvo mayor fama [3]. Otro avance importante en las vacunas se dio en el año de 1886, cuando surge el concepto de las vacunas muertas gracias a los experimentos realizados por Daniel E. Salmon y Theobald Smith con la bacteria de la salmonelosis [5]. Con la llegada del siglo XX empieza una revolución en las vacunas, se crean los primeros toxoides contra la difteria (1923) y el tétanos (1926), además se autorizan las primeras vacunas polivalentes para influenza (década de 1940) de Francis y Magill [3, 6] y para la poliomielitis creada por Albert Sabin (1954) [7] que fue aprobada hasta 1963, esta última también fue la primera vacuna oral con licencia. En las últimas décadas del siglo XX se crearon las vacunas conjugadas, y con la llegada de la era de la ingeniería genética y la bioinformática se crearon las primeras vacunas subunitarias y recombinantes [3, 8], ya para el siglo XXI se aprobaron las primeras vacunas desarrolladas con partículas tipo virus (VLP, por sus siglas

en inglés)[9]. En el **Cuadro 1**, se enlistan a través del tiempo las vacunas aprobadas para uso en humanos.

Cuadro 1. Esquema del desarrollo de vacunas humanas (Se indica la fecha de la licencia)			
Viva atenuada	Organismo muerto	Proteína nativa o polisacáridos	Diseñado genéticamente
Siglo XVIII			
Viruela (1798)			
Siglo XIX			
Rabia (1885)	Tifoidea (1896) Cólera (1896) Plaga (1897)		
Primera mitad del siglo XX			
Tuberculosis (bacilo Calmette- Guérin) (1927)	Tos ferina (1926)	Toxoide diftérico (1923)	
Fiebre amarilla (1935)	Influenza (1936) Tifus (1938) Encefalitis por garrapatas (1937)	Toxoide tetánico (1926)	
Segunda mitad del siglo XX			
Polio (oral) (1963)	Polio (inyectada) (1955)	Polisacárido de neumococo (1977)	Hepatitis B antígeno superficial recombinante (1986)
Sarampión (1963)	Rabia (cultivo celular) (1980)	Polisacárido de meningococo (1974)	Lyme OspA (1998) ^b
Paperas (1967)	Encefalitis japonesa (cerebro de ratón) (1992) ^b	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b polisacárido (1985) ^b	Cólera (toxina B recombinante) (1993)
Rubéola (1969)	Encefalitis transmitida por garrapatas (1981)	Meningocócico conjugado (grupo C) (1999) Reino Unido ^a	
Adenovirus (1980)	Hepatitis A (1996)	<i>H. influenzae</i> tipo b conjugado (1987) ^a	
Tifoidea (<i>Salmonella</i> Ty21a) (1989)	Cólera (WC-rBS) (1991)	Hepatitis B (Derivado de plasma) (1981)	
Varicela (1995)		Polisacárido tifoideo (Vi) (1994)	
Rotavirus (1999)		Tos ferina acelular (1996)	
Cólera (atenuada) ^b (1994)		Ántrax proteínas secretadas (1970)	
Siglo XXI			
Influenza invernal (2003)	Encefalitis japonesa (2009) (Células Vero)	Neumococo conjugado (heptavalente) (2000) ^a	Virus del papiloma humano recombinante (cuadrivalente) (2006)
Rotavirus (atenuado y nuevo reordenamiento) (2006) Rotavirus (monovalente) (2008) Cólera (oral) (2016)	Cólera (WC únicamente) (2009)	Neumococo conjugado (13-valente) (2010)	Virus del papiloma humano recombinante (bivalente) (2009) Virus del papiloma humano (9-valente) (2014) Meningococo tipo B (factor fH) (2014) Meningococo tipo B (vacunología reversa) (2015)
Zoster (2006)		Meningococo conjugado (cuadrivalente) (2005) ^a	

^a Polisacárido capsular conjugado con proteínas transportadoras. ^b Ya no está disponible.
Modificado de Plotkin y col., 2018

1.2 Tipos de vacunas y sus características

Vacunas inactivadas o muertas: están constituidas por patógenos que no se van a replicar, siendo esta una de sus mayores ventajas, además se pueden usar en población vulnerable como personas inmunocomprometidas [10]. Los patógenos se amplifican principalmente por cultivo celular o huevos y se inactivan por medios químicos como: formaldehído, glutaraldehído y β -propiolactona; o por medios físicos como: pH, temperatura y luz ultravioleta [11]. La inactivación se da por cambios bioquímicos tanto en las proteínas como en el genoma de los patógenos, entre los cambios se encuentran: alquilación de ARN y ADN, entrecruzamiento de ADN y ARN con proteínas de la cápside, desnaturalización de proteínas de superficie o rompimiento del genoma [12]. Sin embargo, tienen algunos problemas asociados. Al ser patógenos inactivados no generan una respuesta inmune robusta, por lo que es necesario utilizar adyuvantes [13]. Una inactivación deficiente podría generar problemas indeseados. Su manufactura involucra cultivos de grandes cantidades del agente infeccioso, lo cual, hace que sean un peligro para el personal y el medio ambiente. En el proceso de propagación y purificación de los patógenos, se puede contaminar con proteínas no deseadas que pueden llegar a causar reacciones adversas como las alergias [14].

Vacunas atenuadas: son hechas a base de patógenos que se les ha reducido su virulencia o la habilidad para causar la enfermedad. La atenuación puede ser por medio de pases sucesivos en cultivos celulares, métodos químicos y genéticos [13]. Un beneficio importante es que mimetiza la infección natural, su capacidad inmunogénica es más fuerte que la de las vacunas inactivadas. Sin embargo, muestran algunas desventajas, son termolábiles, si no se logra la atenuación en los patógenos implica un riesgo para los individuos, incluso existe el riesgo de revertir la virulencia, siendo este último punto su mayor desventaja [10, 15].

Vacunas fraccionadas y subunitarias (en este apartado se incluyen toxoides, vacunas a base polisacáridos y vacunas conjugadas): Las vacunas fraccionadas son formuladas a

base de agentes infecciosos desensamblados en sus diferentes componentes. Primero hay un proceso de inactivación y posteriormente se fraccionan obteniendo, envoltura externa, interna, proteínas de matriz, proteínas nucleares, entre otras, pero la inmunización se realiza con el total de fracciones. En el caso de las vacunas subunitarias, una vez inactivados los patógenos, se purifican componentes específicos para hacer la vacuna [11, 14]. Los toxoides son vacunas elaboradas con la toxina del patógeno a la que se le hace un proceso de detoxificación usando métodos químicos, físicos (calor) o ambos. Las vacunas de polisacáridos solo incluyen polisacáridos capsulares que son moléculas grandes con antígenos repetidos. Por otro lado, las vacunas conjugadas se derivan del enlace covalente entre un polisacárido y una proteína portadora que puede ser una toxina de otro patógeno. Las ventajas que tienen las vacunas fraccionadas y subunitarias es que no generan la enfermedad, menor riesgo de efectos adversos y pueden ser utilizadas en personas inmunocomprometidas. Sin embargo, este tipo de vacunas muestran un efecto inmune reducido, por lo que necesitan ser administradas con un adyuvante, además la producción es más compleja y costosa porque se debe identificar la fracción o componente causante de la infección [10, 13, 16].

Vacunas recombinantes: son vacunas que utilizan proteínas específicas de los agentes infecciosos, pero que son producidas utilizando ingeniería genética [10]. Secuencias genéticas son clonadas en un plásmido o un báculo para su posterior expresión en algún organismo diferente al original, algunos sistemas pueden ser bacterianos [17], virales [18], levaduras [19], células de insecto [20], células de mamífero [21] e incluso células de plantas [22]. Este tipo de sistemas tiene muchas ventajas, se obtienen grandes cantidades de la proteína de interés, no hay riesgo de generar la enfermedad, mayor estabilidad, sin embargo, son costosos los métodos de producción y necesitan un adyuvante para potenciar el efecto [10].

Vacunas VLP: son vacunas recombinantes, pero que se clasifican en un grupo específico por sus características. Son partículas que varían en tamaño de 20-1800 nm [23]. La cualidad de esta biotecnología es, que mimetiza la morfología de una partícula viral,

pero sin contener material genético, lo que es beneficioso porque no se recombinan, no mutan y no se replican. Por otro lado, inducen la respuesta inmune desplegando en su superficie los antígenos de interés [24, 25], por ser partículas pequeñas les permite llegar libremente a los linfonodos y ser fácilmente endocitados por las células presentadoras de antígenos (CPA), tanto la respuesta celular como la humoral son estimuladas [26]. Y entre sus desventajas se ha observado una respuesta inmune débil [27], por lo que necesitan utilizar adyuvantes, lo que lleva a adquirir las desventajas de los adyuvantes.

Vacunas de vectores vivos: en el campo de la medicina veterinaria, existen vacunas que utilizan a un patógeno como vector. Con ayuda de ingeniería genética un agente infeccioso lleva la información genética que codifica para proteínas de otros patógeno que se quiere combatir [14]. Se han tratado de utilizar vectores virales como los poxvirus [28] y herpesvirus [29], bacterianos (salmonella) y protozoarios (Eimeria), sin embargo, los de mayor éxito son los virales. Este tipo de vacunas funcionan mimetizando al agente causal de interés para genera una respuesta inmune similar a la que se obtiene con agentes infecciosos atenuados, ejemplos de vacunas autorizadas son la vacuna contra Newcastle y Marek en aves [30], la vacuna contra la mixomatosis y virus hemorrágico en conejos [31]. A pesar de la buena respuesta que se ha obtenido, estas vacunas siguen teniendo desventajas como el uso de adyuvantes para mejorar la respuesta, son poco estables a temperatura ambiente y su costo de producción es elevado [14].

Vacunas de ácidos nucleicos: al igual que las vacunas de vectores vivos, solo se han autorizado para uso veterinario, un ejemplo es la vacuna contra la enfermedad del páncreas del salmón [32]. Se basan en el uso de vectores en los que se ha clonado un gen de un patógeno de interés para ser posteriormente inyectado y así expresar algunas de sus proteínas dentro del huésped, también se utiliza ARN mensajero de forma directa. Sus ventajas son que puede imitar la infección natural, no muestran riesgo de infección y estimulan tanto la respuesta celular como la humoral, no representa un riesgo para el personal que desarrolla las vacunas y son más estables. Sin embargo, la respuesta inmune llega a ser débil cuando se utilizan cantidades insuficientes de ácido nucleico, requieren

adyuvante, pueden causar autoinmunidad y si bien hay un costo-beneficio, es elevada la inversión para su desarrollo [33, 34].

1.3 Adyuvantes

Como se describió anteriormente, el propósito principal de la vacunación es montar una respuesta inmune para proteger contra un agente infeccioso específico, sin embargo, la mayoría de las vacunas subunitarias necesitan utilizar un aditivo para mejorar esta respuesta, a excepción de las vacunas atenuadas y algunas inactivadas. Este aditivo se conoce como adyuvante, el cual ayuda a estimular una respuesta inmune robusta, de larga duración y con dosis menores [35]. Entre los adyuvantes aprobados para su uso en humanos y animales se encuentran:

Sales de aluminio: entre estos adyuvantes se encuentran el hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, el sulfato hidroxifosfato de aluminio amorfo [36]. Las sales de aluminio se caracterizan por formar un particulado multivalente junto con el antígeno [37]. Se ha demostrado que las sales de aluminio estimulan la respuesta Th2 y en menor grado la respuesta Th1 [38]. Además, estas sales mejoran la recepción y presentación por las CPA, así como la activación del inflammasoma [39]. Aunque estas sales son bien toleradas por las personas y animales, han reportado efectos secundarios como, la formación de granulomas, alergia, neurotoxicidad y estimulación exacerbada de la producción de IgE [40, 41]. Las sales de aluminio se utilizan desde los años 30 y son las más frecuentemente incluidas en las vacunas que se utilizan en humanos [36].

Adyuvantes de emulsión: en un principio las emulsiones utilizadas seguían la fórmula agua-aceite, pero se observaron efectos adversos drásticos con el adyuvante de Freund, limitando su uso en algunas vacunas veterinarias, posteriormente se implementó otra metodología que son las emulsiones aceite-agua y son las más utilizadas actualmente [36]. En este grupo se encuentran el MF59 formado por escualeno, polisorbato 80, trioleato de sorbitán y citrato de trisódico dihidratado [42], el AS03 formado por polisorbato 80 y dos

aceites biodegradables: el escualeno y DL- α -tocoferol [43]. Este tipo de adyuvante estimula respuesta inflamatoria más fuerte que las sales de aluminio, induce activación de células en el sitio de inmunización, favoreciendo la endocitosis de antígenos por células presentadoras de antígenos, favorece la producción de anticuerpos y tienen efecto depósito [36, 39]. Entre sus efectos adversos se encuentran dolor y hematomas en el sitio de inyección, así como dolor muscular [44], por otro lado se ha hecho una asociación entre el AS03 y narcolepsia [35]. Además estos adyuvantes tienen un alto costo [45].

Adyuvantes basados en agonistas de TLRs: entre estos se encuentran los CpG-oligodeoxinucleótidos o CpG-ODN que son moléculas sintéticas de ADN con un esqueleto de fosforotionato que contienen motivos de CpG no metilados [46]. Entre las características de los CpG-ODN se encuentran la inducción de la respuesta Th1, la activación de las CPA, la activación del TLR9 que mejora la respuesta celular y humoral y la flexibilidad en las vías de administración, por otro lado se cree que podrían llegar a causar enfermedades autoinmunes o choque séptico [47]. También en este grupo de adyuvantes se encuentra el AS04 que está compuesto por una sal de aluminio más 3-O-desacil-4'-monofosforil lípido A (MPL) que se caracteriza por estimular el TLR4, el reclutamiento de células, producción de citocinas y en general de promover las respuesta celular y humoral [48]. Como efectos adversos al AS04 solo se ha detectado inflamación, enrojecimiento y dolor en la zona de la inyección y como síntoma, mialgias [49]. Otra desventaja es su alto costo [45].

AS01B: Es un adyuvante de reciente autorización y que se compone de MPL y QS-21, este último es un extracto de la corteza de un árbol, *Quillaja saponaria*, estos dos compuestos son formulados en liposomas. Este adyuvante estimula la respuesta de células T, la producción de anticuerpos, de citocinas y el reclutamiento de células del sistema inmunológico, también se le ha atribuido respuesta inmune prolongada [36]. Entre sus efectos adversos se encuentran, dolor, inflamación y enrojecimiento en la zona de la inyección, también mialgias, fatiga, fiebre y sudoración [50, 51].

1.4 Desarrollo de vacunas de nueva generación

Aún con los beneficios y los avances que se han hecho en el área de la vacunación, ésta sigue representado un desafío e inversión importante para las economías en desarrollo y muchas veces son insuficientes sus propios recursos para cubrir los gastos de vacunación [52, 53], además estas naciones representan un foco de importancia epidemiológica a nivel mundial porque cuentan con el mayor número de personas vulnerables a enfermedades infecciosas, lo que puede provocar brotes que lleguen a convertirse en pandemias como la de coronavirus del 2019 (COVID-19) [2, 54].

De la misma manera que se busca la reducción de los costos de producción, distribución y aplicación de las vacunas, también se busca eliminar o disminuir los efectos adversos de las vacunas actuales tanto de los antígenos como de los aditivos, principalmente los adyuvantes que llegan a generar granulomas, alergias e incluso se les ha atribuido efectos neurotóxicos [55, 56]. La OMS (2013) junto con otras organizaciones plantearon en su plan de vacunación, la inversión en investigación y desarrollo de nuevas tecnologías que mejoren las características de las vacunas, principalmente en disminuir su costo, facilitar las vías de administración y aumentar la termoestabilidad, este último punto como objetivo principal ya que la cadena fría representa aproximadamente el 80 % del costo de las vacunas [58, 59].

En este sentido, se han ido desarrollando una gran variedad de biomateriales que hasta el momento muestran propiedades favorables para el desarrollo de vacunas, principalmente mejorando la respuesta inmune, la estabilidad y la disminución de efectos adversos.

1.5 Biomateriales

Liposomas: son vesículas esféricas a base de lípidos de aproximadamente 25-1000 nm, pueden ser artificiales o provenir de algún microorganismo. Los liposomas están conformados por una o dos capas de lípidos que contienen en el centro una unidad acuosa.

Son biodegradables, biocompatibles y poco tóxicos [60]. Su importancia inmunológica es que inducen tanto respuesta humoral como celular, mientras que su efecto adyuvante es que forman un sitio de depósito en el lugar de la inoculación y permite presentar los antígenos a las CPA [61]. Sin embargo, su producción es costosa, su estabilidad es poca y es dolorosa su aplicación [62].

Polímeros y copolímeros: un polímero se define como una molécula de una subunidad repetida. Mientras que los copolímeros son moléculas repetidas de diferentes subunidades [63]. Los principales polímeros utilizados en el desarrollo de vacunas se pueden dividir en dos, los sintéticos como, el ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), ácido poli-láctico (PLA), polietilenglicol (PEG) y poliestireno, y los polímeros naturales como el ácido poli g-glutámico y el quitosano [64]. Los polímeros se pueden preparar como sistema de liberación de diferente manera, encapsulando al antígeno, llevándolo en su superficie o simplemente mezclado en una solución [63]. De los sintéticos el más utilizado y con mejores resultados es el PLGA, ha mostrado no ser tóxico, estimular la respuesta tanto celular como humoral, prolonga el periodo de liberación de antígenos y genera respuesta inmune por diferentes vías de inmunización, oral, intramuscular, subcutánea entre otras. Por otro lado, el quitosano exhibe algunas bondades como no ser tóxico, modificar su forma y tamaño fácilmente, muestra un potencial de adyuvante mejor que el aluminio, estimula la fagocitosis y es biodegradable [65–67].

Nanopartículas de proteínas de autoensamblaje (SAPNs) y péptidos de autoensamblaje (SAPs): incluyen proteínas virales, proteínas de compartimentos de bacterias y ribonucleoproteínas de células eucariontes (vaults). Las vaults contiene 96 unidades de proteína y tienen un tamaño aproximado de 40 nm de ancho por 70 nm de largo, y se ensamblan en forma de barril, el antígeno es empacado dentro cuando se mezclan [68]. La ferritina, es una proteína bacteriana que naturalmente forma nanopartículas de 24 unidades idénticas de aproximadamente 12 nm [69], han mostrado ser excelentes mimetizadores estructurales y antigénicos de virus, lo que hace que sean buenos para estimular la respuesta inmune humoral [70]. Las nanopartículas SAPs, son unidades

pensadas para desplegar múltiples copias de antígenos (60 copias en promedio), de aproximadamente 25 nm de tamaño [71]. Los antígenos pueden ser agregados en el N- o C-terminal de cada monómero del SAP. Estas partículas, han mostrado estimular tanto la respuesta humoral como la celular [72]. Un ejemplo de proteína de autoensamblaje es la poliedrina, que es una proteína que al autoensamblarse forma la estructura denominada poliedra y que es producida por los baculovirus, virus que infectan de manera exclusiva a insectos. Esta propiedad de autoensamblaje de la poliedrina en trabajos recientes ha demostrado potencial como acarreador de proteínas, estimula la producción de anticuerpos y en su forma nativa tiene características de termoestabilidad [73, 74]. Las características de la poliedrina son deseadas en las vacunas, pero hasta ahora han sido poco estudiadas en este campo.

1.6 Baculovirus y su ciclo de vida

Los baculovirus son virus patogénicos de los insectos, que se caracterizan por tener un ciclo de vida (Figura 1) en el que se pueden diferenciar dos fases [75], la primera es la infección temprana en la que las poliedras o cuerpos de oclusión (OB, por sus siglas en inglés oclusion bodies) conteniendo los viriones, son ingeridos por una larva de insecto. Dentro del intestino medio, por la acción del pH alcalino y de proteasas se disuelven las poliedras, liberándose los virus, los cuales, infectan las células de la pared intestinal, donde se replican y de donde son liberados los virus gemados (BV, por budded virus en inglés) que llevan membrana celular, y a través de la hemolinfa infectan todas las células del insecto. En la segunda etapa, muchos de los virus replicados, entran al núcleo, donde son ocluidos en una matriz proteica, a estos virus se les denomina virus derivados de oclusión (ODV, por occlusion-derived virus en inglés). Esta matriz proteica que forma los OB tiene como función proteger a los virus cuando el insecto se descomponga totalmente y estén libres en el medio ambiente hasta que otro insecto llegue a ingerirlos [75–77].

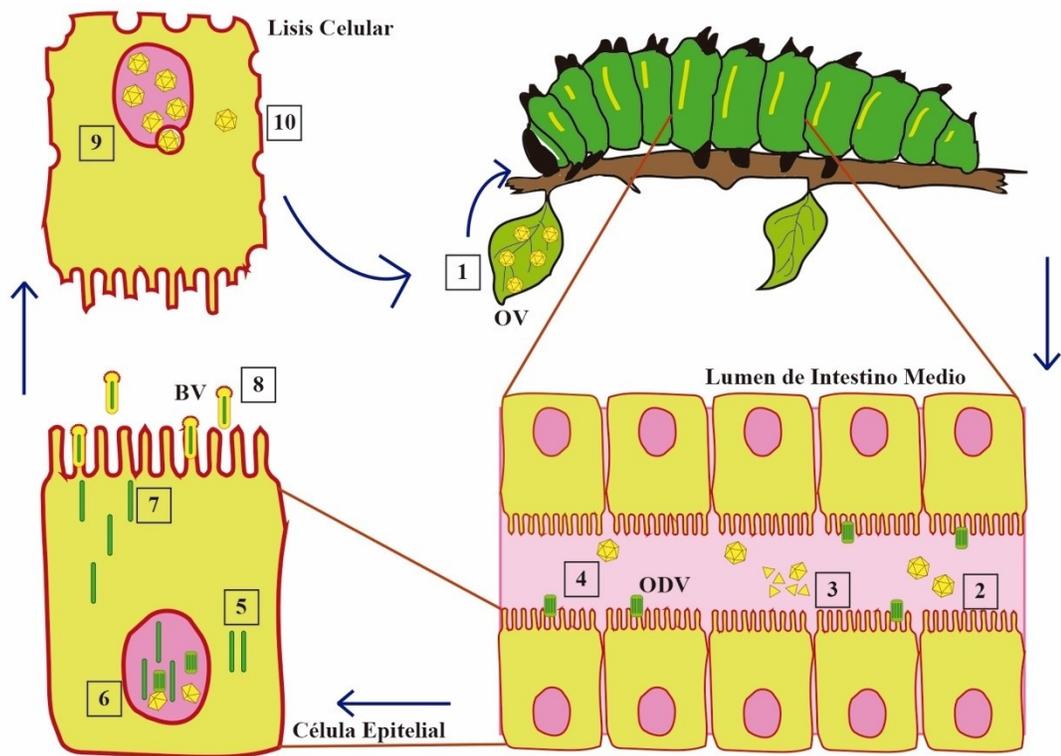


Figura 1. Ciclo de vida de los baculovirus. 1) Los cuerpos de oclusión (OB) que se encuentran en el ambiente son ingeridos por una larva de un insecto. 2) Los OBs llegan al intestino medio de la larva. 3) Por acción del pH alcalino se degradan los OB. 4) Los virus liberados de los OBs penetran en las células ayudados por enzimas virales. 5) Las nucleocápsidas son liberadas en citoplasma y el ADN llega al núcleo. 6) El genoma queda expuesto y empieza la replicación y traducción de genes tempranos. 7) Ensamblaje del genoma dentro de las nucleocápsidas. 8) Empieza la infección de otros órganos por los BVs. 9) Replicación y traducción de genes tardíos, se acumulan cuerpos de oclusión en el núcleo. 10) Lisis celular, muerte del organismo y liberación al ambiente de los OBs. Modificado de Haase y *col.*, [78].

1.6.1 Poliedras y poliedrina

Los baculovirus de la fase tardía denominados ODVs se encapsulan en un cristal denominado cuerpo de oclusión o poliedra, esta estructura tiene la función de proteger y mantener viables a los baculovirus en el medio ambiente durante décadas [79]. Las poliedras son resistentes a la degradación de condiciones ambientales, incluso dentro del intestino del huésped los protege de la degradación enzimática [77, 80, 81].

Las poliedras están formadas casi en su totalidad por una proteína, la poliedrina [75]. La poliedrina, dependiendo el baculovirus tendrá diferente número de aminoácidos. Sin embargo, para este trabajo se tomó de referencia la poliedrina (**Figura 2A**) de *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), que es una proteína de 245 aminoácidos (aa) con un peso molecular de ~29 kDa, esta proteína forma trímeros (**Figura 2B**) y al unirse cuatro subunidades de trímeros (dodecaedro) (**Figura 2C**) forma la celda unitaria del cristal que por múltiples repeticiones forma los OBs o poliedras (**Figura 2D**) [75, 82–84]. Para que se formen los cuerpos de oclusión es necesario que haya interacciones de tipo iónicas, hidrofóbicas y puentes disulfuro (**Figura 2**) [83, 84].

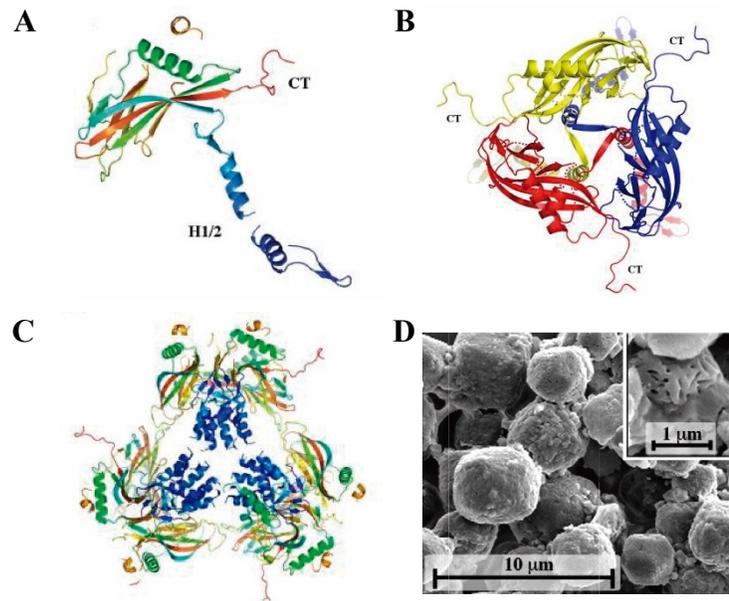


Figura 2. Representación de la estructura del cristal de poliedrina y formación de la poliedra de núcleopoliedrovirus. **A)** Representación de los diferentes plegamientos de la poliedrina. La región de las hélices centrales H1/2 estabilizan las estructuras tetraédricas. Las moléculas se colorean en un gradiente de azul *N-terminal* a rojo *C-terminal* (CT). **B)** Ensamble trimérico, cada color representa una molécula de poliedrina. **C)** Representaciones de los grupos tetraédricos, se resalta en el centro la localización y funciones de las regiones helicoidales N-terminales. **D)** Microscopía electrónica de barrido, se muestra la poliedra de *Wiseana nucleopolyhedrovirus* (WNPV). Se observan huellas de virus en las partículas. Modificada de Coulibaly y col., [83].

2. Antecedentes

La primera poliedra recombinante de la que se tiene registro, fue hecha por el grupo de Fraser y *col.*, [85]. En este trabajo insertaron un péptido de 9 aa (aminoácidos 98-106) de hemaglutinina del virus de influenza (HA) en diferentes posiciones de la secuencia de la poliedrina, lo que lograron fue obtener poliedras con diferentes conformaciones. Muchos investigadores a raíz de esto vieron potencial en la poliedra para formular vacunas, inmunoensayos, desarrollar insecticidas biológicos y sistemas de expresión de proteínas [76].

Para 1991, Jarvis y *col.*, [86] descubrieron la región de aminoácidos de la poliedrina que es necesaria para que se siga autoensamblando, esta región abarca del aminoácido 19 al 110 y también identificaron la región que contiene la señal de localización nuclear (KRKK, posición 32-35).

Más adelante, Je y *col.*, (2003) [87] fusionaron la proteína verde fluorescente al C-terminal de la proteína completa de poliedrina, pero lo que observaron fue que no se formaba la poliedra, sin embargo, cuando se combinaba la expresión de la poliedrina quimérica con la poliedrina silvestre (wt) sí se lograba obtener poliedras, las cuales se podían observar con luz ultravioleta (UV) porque las poliedras ahora tenían fluorescencia por la GFP.

Uno de los primeros estudios que evaluó la respuesta inmunológica generada por poliedras recombinantes fue llevado a cabo por McLinden y *col.*, (1992) [88], su grupo produjo poliedras que contenían un péptido de la hemaglutinina (HA) del virus de la influenza en el amino terminal de la poliedrina de AcMNPV. Con las poliedras recombinantes se inmunizaron ratones. Primero solubilizaron las partículas y las administraron con adyuvante, produciendo así anticuerpos específicos contra la HA. Pasaron varios años para que Lee y *col.*, en 2012 [89] evaluaran la inmunogenicidad de la glicoproteína E2 del virus de la fiebre porcina clásica. En este estudio utilizaron la poliedra

de *Bombyx mori Nucleopolyhedrovirus* (BmNPV). Inmunizaron ratones BALB/c con las poliedras solubles purificadas, pero solo lograron detectar una pobre respuesta contra el antígeno de interés. Ese mismo año Kim *y col.*, [90] fusionaron las glicoproteínas gB y gC del virus de pseudorabia a la poliedrina, utilizando el mismo sistema de BmNPV expresaron las poliedras recombinantes, ellos no inmunizaron animales, únicamente hicieron la evaluación de las partículas *in vitro* y ambas proteínas fueron reconocidas por anticuerpos específicos tanto a poliedrina como a gB y gC .

En nuestro grupo, Sampieri *y col.*, haciendo un análisis de la estructura secundaria de la poliedrina identificaron una región importante para su autoensamblaje. La región se encuentra en 1-110 aa y están constituida por dos dominios, cada domino formado por dos betas plegadas seguidas de una alfa hélice. En el estudio fusionaron la GFP como reportero en la región C-terminal del péptido 1-110 aa de la poliedrina (PH₍₁₋₁₁₀₎GFP). Cuando coexpresaron PH₍₁₋₁₁₀₎GFP con la poliedrina silvestre (wt) observaron que PH₍₁₋₁₁₀₎GFP era incorporada a las poliedras canónicas. También observaron que al expresar de manera individual en células de insecto a PH₍₁₋₁₁₀₎GFP se formaban agregados amorfos en el núcleo de las células, estos agregados no contenían baculovirus y en su mayoría eran de tamaños nanométricos, que podían purificarse con centrifugaciones a baja velocidad [73]. Mientras que las poliedras wt son de formas regulares, pueden llegar a medir hasta 2 µm y en su interior conservan baculovirus [77]. También se reportó que la inmunización de ratones con PH₍₁₋₁₁₀₎GFP generaba anticuerpos contra GFP y no causaba inflamación en el sitio de inoculación [91]. Sin embargo, no se exploraron títulos de anticuerpos, isotipos de inmunoglobulinas, respuesta celular y respuesta de memoria.

3. Justificación

Las partículas de origen proteico muestran ventajas para ser usadas como sistemas de liberación de moléculas. Varios estudios han utilizado estas partículas como acarreadores de antígenos con propósitos vacunales. Entre las ventajas que se han demostrado en el uso de acarreadores particulados en las vacunas son: la purificación basada en centrifugaciones a velocidades relativamente bajas, mejorado la separación de otros componentes celulares. Por ser partículas proteicas muestran biocompatibilidad con los sistemas biológicos, tanto *in vitro* como *in vivo* son bien aceptados. Además, los acarreadores ayudan a la estimulación del sistema inmunitario, lo que mejora la respuesta a patógenos. También se ha demostrado que algunos acarreadores dan estabilidad a los antígenos, impidiendo su fácil degradación.

Las ventajas que presentan los acarreadores particulados de origen proteico generalmente no se presentan en las vacunas que están en el mercado. Muchas de las vacunas comerciales necesitan métodos especializados para la purificación de los antígenos. Para mejorar la respuesta inmunológica, los antígenos son acompañados de un adyuvante, sin embargo, los efectos adversos que se han reconocido en vacunas también son atribuidos a los adyuvantes. Por otro lado, la estabilidad de las vacunas depende de la integridad de la cadena fría, si ésta es vulnerada se pierde la efectividad y se reduce la vida de anaquel del biológico.

Se ha demostrado que la molécula proteica PH₍₁₋₁₁₀₎ tiene la capacidad de formar partículas, y aún después de fusionarle alguna proteína de interés sigue formando partículas. La formación de partículas por parte de PH₍₁₋₁₁₀₎ podría utilizarse como acarreador de antígenos para su uso en vacunas. Sin embargo, no se ha caracterizado su efecto biológico en la respuesta inmune, es decir, si estimula la respuesta humoral, celular y de memoria o si presenta efecto adyuvante. De igual manera, no se ha establecido si PH₍₁₋₁₁₀₎ conserva su propiedad de termoestabilidad que se observa en su forma silvestre y si esta propiedad es compartida al antígeno fusionado. De confirmarse la termoestabilidad,

reduciría el costo que implica la cadena fría. Demostrar los efectos inmunológicos y de termoestabilidad de las partículas PH₍₁₋₁₁₀₎ servirá para proponer a este péptido como un candidato para el desarrollo de vacunas de nueva generación.

4. Hipótesis

Los antígenos integrados en nanopartículas de poliedrina son termoestables y generan una respuesta inmune robusta y específica sin necesitar de adyuvantes.

5. Objetivos

5.1 *Objetivo general*

Caracterizar la respuesta inmune y de termoestabilidad de las nanopartículas PH₍₁₋₁₁₀₎GFP.

5.2 *Objetivos específicos*

- Producir y purificar nanopartículas de poliedrina PH₍₁₋₁₁₀₎GFP.
- Evaluar la morfología de PH₍₁₋₁₁₀₎GFP.
- Determinar la relación dosis respuesta.
- Evaluar la respuesta inmunológica humoral y celular.
- Determinar si las nanopartículas generan memoria inmunológica.
- Evaluar el efecto adyuvante de las nanopartículas de poliedrina.
- Estimar la estabilidad de las nanopartículas en diferentes condiciones de temperatura.
- Medir la respuesta inmune generada con nanopartículas de diferentes tamaños.
- Realizar una estimación de la dureza de las nanopartículas PH₍₁₋₁₁₀₎GFP

6. Materiales y métodos

6.1 Generación de baculovirus recombinantes

La generación de los baculovirus recombinantes se llevó a cabo usando el vector de expresión pFastbacTM1 del sistema de expresión de baculovirus Bac-to-Bac[®] (Thermo Fisher). Se obtuvieron las NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP siguiendo un protocolo previamente publicado [73]. Bajo el promotor de la poliedrina (*polh*) se clonaron las primeras 330 pb de la región N-terminal de la poliedrina y en su C-terminal se ligó la secuencia genética de la GFP. El promotor y la secuencia de la poliedrina correspondieron al virus *Autographa californica Multiple Nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV). Para la generación de la poliedrina quimérica PH-wt-GFP se utilizó el vector de expresión pFastbacTM Dual (Thermo Fisher), siguiendo el protocolo de Sampieri y col., [73], se clonó bajo el promotor *p10* la poliedrina wt y bajo el promotor *polh* la PH₍₁₋₁₁₀₎GFP. Los baculovirus obtenidos se amplificaron, purificaron y titularon siguiendo el protocolo del proveedor (Thermo Fisher).

6.2 Cultivo celular y propagación de baculovirus

La propagación y titulación de los baculovirus se realizó en la línea celular *Spodoptera frugiperda*, Sf9 (ATCC[®]). Las células se mantuvieron en medio Grace suplementado (Thermo Fisher) con suero fetal bovino (SFB) inactivado al 10%, lactoalbúmina 3.30 g/L, extracto de levadura 3.33 g/L, ácido plurónico F-68 1 g/L y antibiótico-antimicótico 10 mg/L. Para la producción de las partículas, las células SF9 (2×10^6 cel/ml) se infectaron con una multiplicidad de infección (moi) de 10 con los baculovirus recombinantes y se mantuvieron a 27°C en agitación a 100 rpm durante.

6.3 Purificación de NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP

6.3.1 Purificación por centrifugación

Cumplidas las 72 horas post infección (hpi) se centrifugaron los cultivos a 4200 g durante 15 min para recuperar los virus y obtener el botón celular. Los botones de células

se suspendieron en solución salina tamponada (PBS; NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7.4), se lisaron mediante sonicación, con 5 ciclos de 20 s x pulsos de 20-30 W (Qsonica 700). Entre cada ciclo se dejó 5 minutos en hielo. Se realizaron 5 lavados con PBS a los lisado hasta obtener las NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP por centrifugación a 14000 g y finalmente se suspendieron en PBS.

6.3.2 *Cuantificación de NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP*

Las partículas PH₍₁₋₁₁₀₎GFP que se obtuvieron para todos los experimentos se cuantificaron usando PierceTM BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher), un ensayo basado en la reducción de cobre y la detección colorimétrica del ácido bicinonínico (BCA).

6.3.3 *Electroforesis de proteína*

Se mezclaron por separado partículas PH₍₁₋₁₁₀₎GFP y GFP soluble (Merck Millipore) con 5 × Laemmli buffer (50 mM Tris-HCL, 3% SDS, 1% β-mercaptoetanol, 20% glicerol, 0.7% azul de bromofenol, pH 6.8). Las proteínas fueron separaron en gel de electroforesis de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) al 12% a 85 V por 2 h 30 min y fueron teñidas usando Coomassie brilliant blue R-250. Para el experimento de los diferentes gradientes se siguió el mismo protocolo.

6.3.4 *Identificación de las proteínas por Western blot*

Después de correr un SDS-PAGE las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Merck Millipore) durante 1 h a 100 V en cámara húmeda usando solución amortiguadora de transferencia (48 mM Tris base, 39 mM glicina, 0.037% SDS, 20% metanol). La membrana fue bloqueada con 5% de leche sin grasa en solución amortiguadora de Tris (TBS; 50 mM Tris-Cl, pH 7.6; 150 mM NaCl) durante toda la noche (ON). Después se colocó el anticuerpo primario específico a GFP (Clontech). El anticuerpo fue usado a una dilución de 1:2000 in TBS-T (0.05% Tween) y 0.5% de leche sin grasa, fue

incubado durante 3 horas en agitación a temperatura ambiente (RT). Terminada la incubación se lavó la membrana 3 veces con TBS-T durante 15 min y se colocó el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) específico a IgG de ratón (Sigma-Aldrich) a una dilución 1:5000 in TBS-T y 0.5% de leche sin grasa. El anticuerpo secundario fue incubado 1h a RT. La lectura de la membrana se realizó utilizando el sustrato SuperSignal® West Femto (Thermo Fisher), la señal se detectó con el equipo C-Digit Blot scanner (LI-COR, USA) y el programa Image.

6.3.5 Evaluación de pureza e integridad de las nanopartículas

La pureza e integridad de NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP frescas y aquellas almacenadas a RT durante 2 años (experimento descrito más adelante) fue llevada a cabo utilizando el equipo Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, USA), equipado con Protein 230 assay kit y el programa de análisis Agilent 2100 expert (Agilent technologies, USA). Se realizó una microelectroforesis siguiendo el protocolo descrito anteriormente [92] y con las indicaciones del desarrollador.

6.4 Caracterización morfológica de las partículas PH₍₁₋₁₁₀₎GFP

6.4.1 Microscopía confocal de células infectadas

Siguiendo el protocolo descrito anteriormente [73], se recuperaron células SF9 infectadas 72 hpi, se lavaron con PBS e incubaron durante 5 minutos con DAPI (4', 6-diamino-2-phenylindole) para marcar el núcleo a una dilución 1:1000 y fueron fijadas en portaobjetos con medio de montaje fluorescente DAKO. La GFP se excitó a 473 nm y DAPI fue excitado a 405 nm. La fluorescencia de emisión fue colectada a 510 nm para GFP y 420 nm para DAPI. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal Fluoview FV10i (Olympus®, Japan), usando el objetivo de inmersión 60 × NA 1.35 (UPLSAPO60XO). Para la edición de las imágenes se utilizó el programa, FV10ASW.

6.4.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM, Transmission Electron Microscopy) en células

La TEM de células SF9 infectadas con baculovirus recombinantes PH₍₁₋₁₁₀₎GFP se llevó a cabo utilizando el siguiente protocolo [73]., brevemente, se centrifugaron las células. El botón celular se lavó solución amortiguadora de cacodilato (0.08 M, pH 7.4) y fijó con 0.6% de glutaraldehído y 0.4% de paraformaldehído en solución de cacodilato por 10 min. Post-fijación fue hecha con 1% de tetróxido de osmio en solución de cacodilato. Las células fueron incluidas en una resina epóxica en donde se realizaron cortes de 90 nm de espesor y fueron contrastadas con acetato de uranilo al 1% por 10 min y con citrato de plomo por 2.5 min. Para observar las muestras se utilizó el equipo JEOL JEM 12,000 EXII a 80 kV (Jeol USA, EUA).

6.4.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM, Scanning Electron Microscope) de nanopartículas purificadas

Las partículas purificadas fueron fijadas con glutaraldehído al 2.5% en solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M, pH 7.4), seguido de una post-fijación con 1% de tetróxido de osmio en solución de fosfatos, después se deshidrataron con gradientes de alcohol, finalmente las muestras fueron secadas a punto crítico y recubiertas con oro para su observación de acuerdo al protocolo descrito anteriormente por Sampieri y *col.*, [73]. Para la observación se utilizó el equipo JEOL JSM 5410LV (Jeol USA, EUA).

6.4.4 Determinación de tamaños por análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA, Nanoparticle tracking analysis)

Se determinó el tamaño de la NPs utilizando el equipo NanoSight instrument (Malvern Panalytical, UK). Las NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP suspendidas en 1 ml de agua estéril fueron inyectadas dentro de una cámara recipiente. Se indicó al equipo realizar 5 lecturas por cada muestra procesada para obtener los promedios de tamaños. El programa

NanoSight (Malvern Panalytical, UK) determinó el coeficiente de difusión de las partículas tomando de referencia el centro de estas y haciendo seguimiento de su movimiento Browniano en tiempo real. El programa basado en la ecuación de Stokes-Einstein calculó el tamaño de las partículas [93, 94].

6.4.5 Experimentos de recuperación de la fluorescencia después de fotoblanqueo (FRAP, Fluorescence recovery after photobleaching) de NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP

Se desarrolló utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 780 (Axio observer.Z1/7) con el objetivo Plan-Apochromat 63 × / 1.40 de aceite DIC M27 (Carl Zeiss, Germany). Para fotoblanquear a las NPs se seleccionó una región de interés (ROI) en cada una de ellas y se expuso esta región a un láser de Ar⁺ de 488 nm con 100% de intensidad relativa. El fotoblanqueo duró 2 s aproximadamente, las imágenes se tomaron a intervalos de 4 min durante 2 h (pinhole de 40.96 μm). Para la detección se utilizó una longitud de onda de 510 nm. La intensidad del láser para tomar las imágenes fue de 1% para evitar fotoblanqueo. Las imágenes fueron analizadas con la ayuda del programa ZEN 2012 (blue edition, Carl Zeiss, Germany) Las imágenes finales y el video fueron editados con el programa ImageJ 1.52n (NIH, USA). Como control de la recuperación de la fluorescencia se utilizaron partículas quiméricas PH-wt-GFP.

6.5 Animales de experimentación

Todos los animales que se utilizaron durante el desarrollo del proyecto fueron provistos por el Bioterio del Instituto de Fisiología Celular, de la UNAM. El protocolo para el uso de animales en la investigación fue aprobado por el Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales (SICUAE) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM (Protocolo número DC-2017/2-3) y por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorios (CICUAL) del Instituto de Fisiología Celular, UNAM (Protocolo número LVD102(66)-16). Para el cuidado, alimentación y

manejo de los animales se siguieron los lineamientos establecidos por el SICUAE, CICUAL y por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

6.6 Inmunización y toma de muestras

Para todos los experimentos se utilizaron ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas de edad. La vía de inmunización fue intramuscular (i.m.) con un volumen final de 50 μ l. Los grupos de ratones recibieron dos inmunizaciones (día 0 y 14), en casos excepcionales se especifica en la metodología. La toma de muestra de sangre se realizó en intervalos de dos semanas iniciando en el día 0 hasta el final del experimento. Las muestras fueron centrifugadas para obtener el suero que posteriormente se congeló a -20 °C. El análisis de los sueros se realizó con un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA). En cada estudio se describen características particulares.

6.7 Dosis respuesta

Se inmunizaron cinco grupos experimentales con 5 ratones cada uno. Los tratamientos fueron los siguientes: grupo 1: PH₍₁₋₁₁₀₎GFP 25 μ g (una dosis); grupo 2: PH₍₁₋₁₁₀₎GFP 25 μ g (dos dosis); grupo 3: PH₍₁₋₁₁₀₎GFP 100 μ g (una dosis); grupo 4: PH₍₁₋₁₁₀₎GFP 100 μ g (dos dosis) y grupo 5: PBS (grupo control). Se tomaron muestras de sangre en intervalos de dos semanas durante 6 meses.

6.8 Evaluación del efecto adyuvante

Se comparó el efecto adyuvante de las NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP contra el hidróxido de aluminio (Alum) (InvivoGen, cat. no vac-alu-250). Con los resultados del ensayo previo se decidió seleccionar el tratamiento NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP 25 μ g para los experimentos posteriores. Cinco grupos de animales con 5 ratones cada uno fueron inmunizados de la siguiente manera: grupo 1: GFP 25 μ g; grupo 2: GFP 25 μ g + Alum; grupo 3: PH₍₁₋₁₁₀₎GFP 25 μ g; grupo 4: PH₍₁₋₁₁₀₎GFP 25 μ g + Alum; y grupo 5: PBS + Alum como grupo control. La

dilución usada para el Alum fue 1:1. Se tomaron muestras de sangre para recuperar el suero en intervalos de 2 semanas durante 24 semanas para medir la respuesta de inmune de anticuerpos y en la semana 4, 16 y 24 se evaluaron títulos de anticuerpos.

6.8.1 Evaluación de memoria inmunológica generada por las partículas PH₍₁₋₁₁₀₎GFP

En la semana 24 del experimento descrito en el apartado anterior, una vez que los títulos de los anticuerpos alcanzaron un nivel cercano al basal, los ratones de todos los grupos fueron reinmunizados con 5µg de GFP soluble sin adyuvante a modo de desafío¹. Se obtuvieron muestras de suero al día 4, 7, 14 y 21 post-reinmunización.

6.8.2 Tipo de respuesta inmune: TH1/TH2

Una vez que se determinó la respuesta inmune de memoria, los sueros de la semana 8 fueron utilizados para determinar el tipo de respuesta inmune, celular o humoral. Se midieron por ELISA los subtipos IgG2a e IgG2b que indican la estimulación de la respuesta celular y el subtipo IgG1 que indica respuesta humoral [95, 96]. Finalmente, se obtuvo la relación IgG2a/IgG2b para determinar el tipo de respuesta que predomina.

6.9 Evaluación de la respuesta celular

6.9.1 Inmunización de ratones

¹ La GFP no es una proteína de un patógeno, sin embargo, se siguió el procedimiento de un experimento de desafío.

Se inmunizaron 5 grupos de ratones (3 ratones por grupo) de la siguiente manera: grupo 1: PH₍₁₋₁₁₀₎GFP 25 µg; grupo 2: PH₍₁₋₁₁₀₎GFP 25 µg + Adyuvante y grupo 3: GFP 25 µg; grupo 4: GFP 25 µg + Adyuvante 5: PBS + Adyuvante. Para este experimento se empleó el Adyuvante Completo de Freund (CFA) (Sigma-Aldrich) y Adyuvante Incompleto de Freund (IFA) (Sigma-Aldrich). La primera inmunización se realizó con CFA y el refuerzo con IFA. Se empleó el Adyuvante de Freund porque a diferencia del hidróxido de aluminio se ha observado mayor estimulación de la respuesta celular [39, 67]. Las muestras de sangre fueron tomadas durante 6 semanas en intervalos de 2 semanas.

6.9.2 *Ensayo de linfoproliferación*

Se realizó la eutanasia a los ratones en la semana 6. Se diseccionaron los bazo y se obtuvieron los esplenocitos mediante perfusión con medio RPMI 1640 (Thermo Fisher). Las células fueron resuspendidas en medio RPMI 1640 suplementado y se incubaron con 5-(y-6)-Carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) (Thermo Fisher) como previamente fue descrito [97]. Posteriormente, las células se colocaron en microplacas de fondo plano (5×10^5 células/pozo) y fueron estimuladas con concanavalina a (ConA) ($3 \mu\text{g ml}^{-1}$) como control de proliferación celular, GFP ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$), PH₍₁₋₁₁₀₎GFP ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) o albúmina ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) como antígeno no relacionado. Las placas se incubaron durante 5 días a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

6.9.3 *Citometría de flujo*

La proliferación celular se evaluó siguiendo protocolos ya establecidos [97, 98]. Después de 5 días las células fueron levantadas y los linfocitos T se marcaron con anti-CD3 conjugado con Ficoeritrina Cianina 5.1 (PE-CyTM5) (BD Biosciences). La proliferación fue determinada por la pérdida progresiva de la fluorescencia de CFSE en cada división celular. Los resultados fueron expresados en porcentaje de proliferación. Para el análisis de la citometría se utilizó el equipo Attune[®] Acoustic Focusing Cytometer (sistema azul/rojo) (Thermo Fisher, USA) con el programa Attune[®] Cytometric Software (Thermo Fisher,

USA), al menos 10,000 eventos fueron colectados. El análisis final de los datos fue hecho usando FlowJo 7.6.2 software (FlowJo LLC, USA).

6.10 Evaluación de la termoestabilidad de PH₍₁₋₁₁₀₎GFP

NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP fueron separadas en alícuotas de 600 µg cada una y se almacenaron en las siguientes condiciones de temperatura: 1) Temperatura ambiente deshidratadas (RTD); 2) Temperatura ambiente suspendidas en PBS (RT); 3) 4 °C; 4) -20 °C y 5) -70 °C. Después de 1, 3, 6 y 12 meses de mantener las NPs en las diferentes condiciones, se tomó una alícuota de cada condición y se inmunizaron ratones, un grupo por cada condición más un grupo control (PBS), con 5 ratones por grupo. Las NPs RTD fueron deshidratadas usando el vacufugeTM concentrator 5301 (Eppendorf, Germany) a una fuerza centrífuga de 240 g a 30 °C por 30 min y fueron resuspendidas en PBS antes de ser inyectadas. En este experimento no se utilizó adyuvante. Las muestras de sangre se tomaron en intervalos de 2 semanas durante 2 meses.

6.11 Experimentos con partículas de diferentes tamaños

6.11.1 Separación de NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP por gradientes de sacarosa

Las NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP se separaron en un gradiente discontinuo de sacarosa. Para formar el gradiente discontinuo se utilizaron 3 concentraciones diferentes de sacarosa: 40%, 50% y 60% (w/v) en agua destilada. En la parte superior de los gradientes se colocaron los lisados, se realizó una ultracentrifugación a 17738 g (SW 40 ti rotor; Beckman Coulter) por 10 min a 4°C. Se recuperaron las NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP de los diferentes gradientes y se realizaron 3 lavados con PBS.

6.11.2 Microscopía confocal de NPs

Las NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP purificadas fueron fijadas con DAKO en portaobjetos (76x26 mm). Para obtener las imágenes se utilizó un Microscopio Olympus[®] IX81 invertido de

campo amplio con objetivo de aceite de inmersión NA 60 × 1.42 (Andor Technology South Windsor, CT, EE. UU.). Los filtros usados de excitación y emisión fueron 470 y 520/40 nm respectivamente. Las imágenes se analizaron con el software ImageJ (NIH, USA).

6.11.3 Respuesta inmune inducida por partículas PH₁₋₁₁₀GFP de diferentes tamaños

Las partículas separadas en el gradiente discontinuo de sacarosa, fueron inmunizadas a grupos de ratones de 5 individuos: grupo 1: PH₍₁₋₁₁₀₎GFP gradiente 40%; grupo 2: PH₍₁₋₁₁₀₎GFP gradiente 50%; grupo 3: PH₍₁₋₁₁₀₎GFP gradiente 60%; grupo 4: PH₍₁₋₁₁₀₎GFP gradiente >60%; grupo 5: PH₍₁₋₁₁₀₎GFP mezcla de gradientes y grupo 6: PBS. Todos los tratamientos fueron inyectados sin adyuvante. Se recolectaron muestras de sangre durante 10 semanas cada 14 días.

6.12 Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA)

Para determinar los anticuerpos IgG y los subtipos de IgG específicos a GFP, los sueros fueron evaluados por ELISA indirecta. Microplacas de 96 pozos fueron tapizadas con 50 µL de GFP a una concentración de 1 µg mL⁻¹ en 0.1 M de solución amortiguadora de bicarbonato de sodio (pH 9.2) a 4 °C durante toda la noche. Las microplacas se lavaron 5 veces con 200 µL de PBS con 0.2% Tritón X-100, se bloquearon posteriormente con 300 µL por pozo de PBS-Tritón + 5% de leche sin grasa por 1 h a 37 °C. Se repitieron los lavados y se colocó en cada pozo 50 µL de cada uno de los sueros de ratone diluidos 1:100 en solución de bloqueo (para los experimentos de los diferentes tamaños de partículas se utilizó una dilución 1:400), se incubaron las placas 1 h a 37 °C. Nuevamente se realizaron 5 lavados y fueron agregados 50 µL de anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (Sigma-Aldrich, USA) a una dilución 1:5000. Para los diferentes isotipos de IgG se utilizó anti-IgG1 de ratón (Thermo Fisher, USA) diluido 1:3000, anti-IgG2a de ratón (Abcam, UK) o anti-IgG2b de ratón (Thermo Fisher, USA) diluido 1:3000, todos conjugados con HRP. Colocado el anticuerpo secundario se incubaron 1 h a 37 °C. 5 lavados más se realizaron y se agregó 50 µL a cada pozo del sustrato 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB) y se incubaron a RT por 20 min. Para detener la reacción se agregaron 50 µL de una solución

0.16 M de ácido sulfúrico. Finalmente, para hacer la lectura de las placas se utilizó el equipo multiskan FC 3.1 (Thermo Fisher, USA) con un filtro de 450 nm. Para la titulación de los sueros se realizaron diluciones dobles seriadas iniciando en 1:50 siguiendo el protocolo descrito.

6.13 Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media \pm SD. Todos los experimentos fueron repetidos al menos una vez con resultados comparables. Se utilizó la prueba estadística *ANOVA* de dos vías para analizar los datos y las de *Tukey* o *Dunnett* como pruebas post-evaluación para la corrección de comparaciones múltiples. En el experimento de FRAP para obtener el porcentaje de recuperación de fluorescencia, el valor inicial del fotoblanqueo (10 min) se restó al valor obtenido al final del experimento (140 min). Para calcular las diferencias en el FRAP se utilizó la prueba estadística t de Student de dos colas, no pareadas. Se calculó área bajo la curva en porcentaje para comparar poblaciones de partículas con respecto a su tamaño. En la titulación de anticuerpos para determinar el punto de corte se utilizó la metodología previamente descrita [99]. Para determinar el porcentaje de proliferación, el valor obtenido en el grupo PBS+Alum se restó a los demás grupos. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ y ns = no significativo. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 7 (GraphPad software, USA).

7. Resultados

7.1 Expresión de la proteína de fusión PH₍₁₋₁₁₀₎GFP de 42 kDa

La construcción genética de GFP unida al C-terminal de la proteína poliedrina (1-110 aa) bajo el promotor de expresión tardía *polh* (**Figura 3A**), se clonó en el vector de transferencia pFastBac1[®] para generar baculovirus recombinantes, estos al infectar células de insecto permitieron la expresión de la proteína de fusión PH₍₁₋₁₁₀₎GFP, que forma nanopartículas como se observa más adelante en la **Figura 5A**. Para comprobar la expresión de la proteína de fusión, se realizaron SDS-PAGE y Western Blot en el que se observó la presencia de la GFP fusionada a la poliedrina (**Figura 3B**).

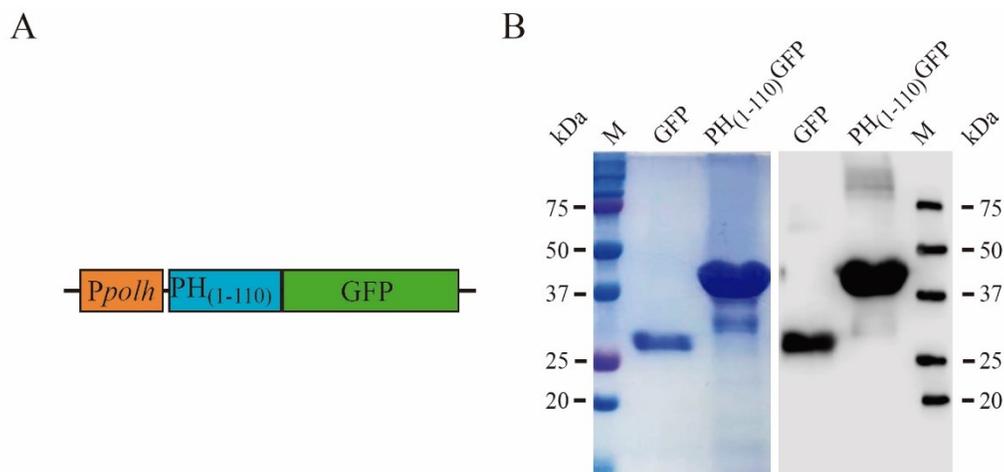


Figura 3. Expresión de la proteína de fusión PH₍₁₋₁₁₀₎GFP en un sistema de baculovirus. A) Esquema del casete de expresión de poliedrina (PH₍₁₋₁₁₀₎) fusionada con GFP. B) Se muestra SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie y Western Blot de la expresión de la poliedrina recombinante usando un anticuerpo anti-GFP. Peso molecular de la GFP ~28 kDa y peso molecular de la proteína de fusión PH₁₋₁₁₀GFP ~42 kDa. M=Marcador de peso molecular.

7.2 Purificación de las nanopartículas por centrifugación

Las nanopartículas se obtuvieron con alta pureza después de pasos sencillo de lavados y centrifugación como se observó en el SDS-PAGE (**Figura 3B**). Para cuantificar la pureza se realizó una microelectroforesis con un Bioanalizador en el que se detectó la

banda mayoritaria correspondiente a PH₍₁₋₁₁₀₎GFP (**Figura 4A**) con una pureza del 80% (**Figura 4B**). Esta pureza se consiguió sin la necesidad de equipo sofisticado o métodos complejos.

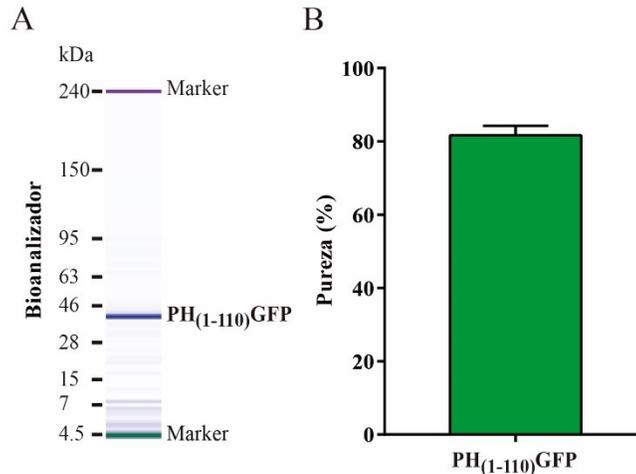


Figura 4. Evaluación de la pureza de NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP obtenidas por centrifugación. A) Se muestra la microelectroforesis de las NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP. B) Los datos obtenidos con el bioanalizador se graficaron para obtener el promedio de porcentaje de pureza. La barra de error indica la media \pm SD (n = 3).

7.3 La fusión de GFP a la poliedrina (PH₍₁₋₁₁₀₎) resulta en la formación de partículas

Por microscopía confocal se observó la formación de partículas fluorescentes por la correcta expresión y plegamiento de la GFP y por la propiedad de autoagregación del péptido PH₍₁₋₁₁₀₎. Se observaron las partículas únicamente en el núcleo (marcado con DAPI) de células de insecto (**Figura 5A**). Con la microscopía electrónica de transmisión (TEM) (**Figura 5B**) y de barrido (SEM) (**Figura 5C**) se advierte que las partículas son de estructura compacta, sin virus, de tamaños diferentes (nano y micropartículas) y morfología irregular.

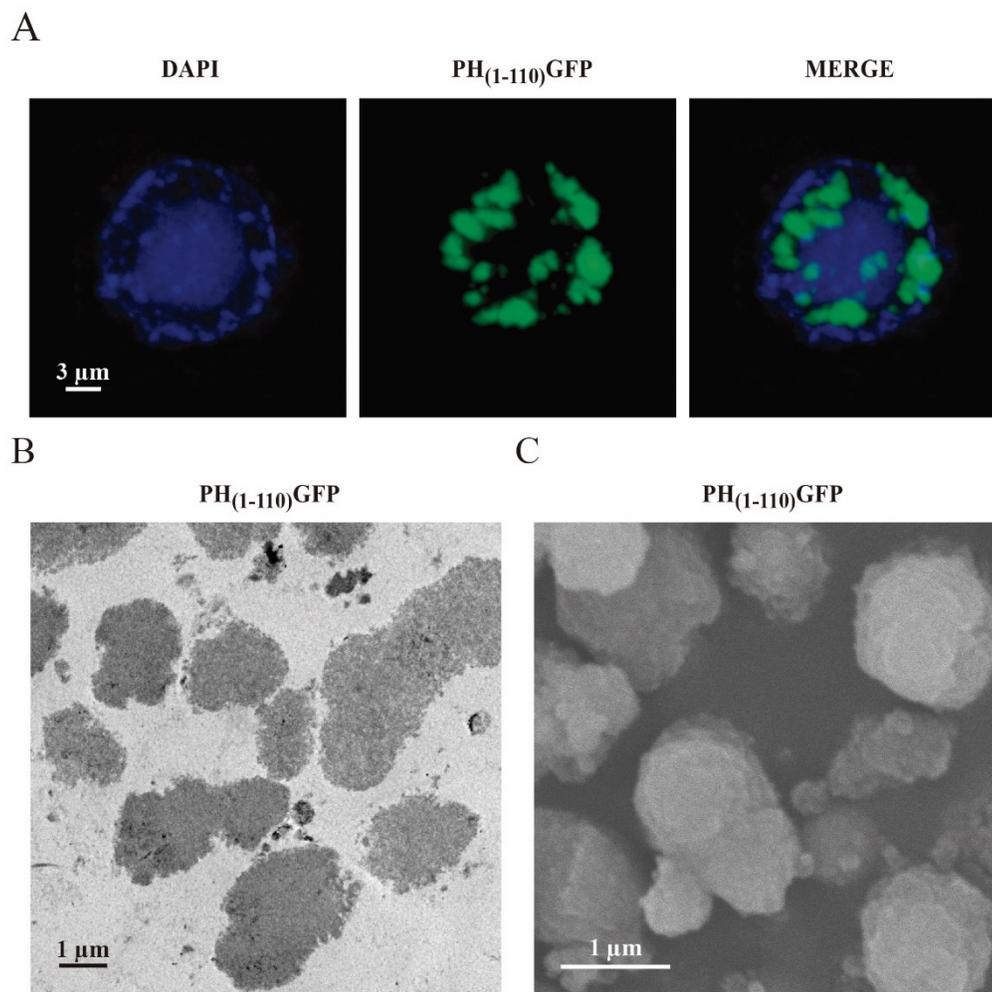


Figura 5. Caracterización morfológica de las partículas PH₍₁₋₁₁₀₎GFP. **A)** Microscopia confocal mostrando la expresión y acumulación de las partículas (en verde) en el núcleo (DAPI en azul) de las células de insecto (SF9), 72 horas post infección cuando se logra la máxima expresión. **B)** TEM muestra las partículas compactas e irregulares. **C)** SEM muestra partículas de diferentes tamaños y formas irregulares.

El límite de difracción de la luz (200nm) no nos permite evaluar el tamaño de las partículas más pequeñas por microscopia confocal y al ser partículas irregulares dependiendo el corte o la posición SEM y TEM solo nos pueden dar un tamaño aproximado. Además, la preparación de las partículas para microscopia puede afectar a las partículas. Para determinar con mayor precisión los tamaños de partículas que forma PH₍₁₋₁₁₀₎GFP se realizó un Análisis de Seguimiento de Partículas (NTA). Como se puede observarse en la gráfica de la **Figura 6A**, hay mucha variación en el tamaño de las

partículas desde 50 nm a 1000 nm. El 80% de las partículas se encuentran en el rango de 50-250 nm (**Figura 6B**).

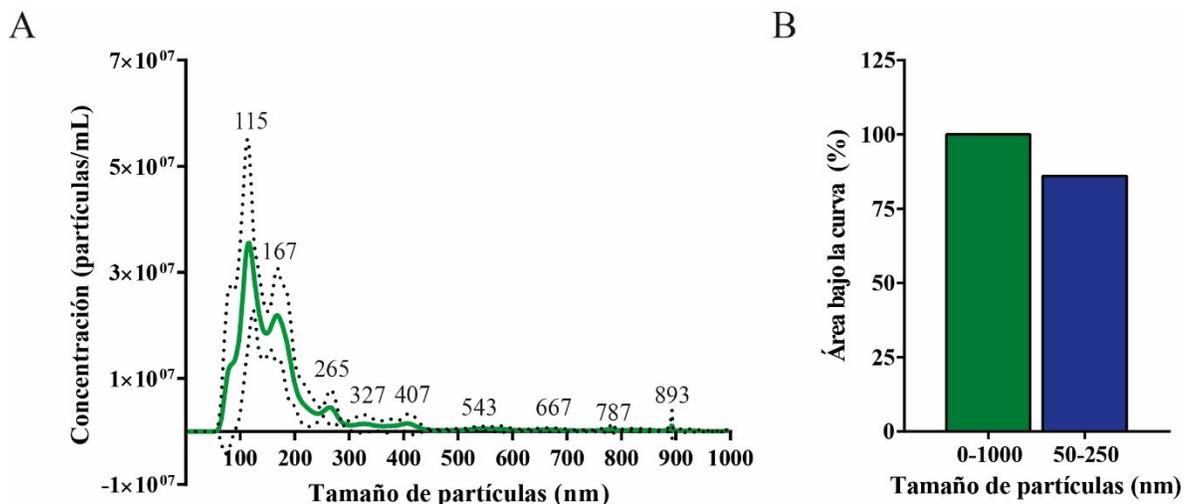


Figura 6. Determinación del tamaño de partículas formadas por la expresión de PH₍₁₋₁₁₀₎GFP. **A)** La evaluación de partículas con el NTA muestra las diferentes poblaciones de tamaños (picos) de partículas en 1 mL de solución. **B)** Área bajo la curva (porcentaje) del total de partículas y de la población mayoritaria. Las líneas punteadas indican la SD.

Para determinar si las NPs son cristales se utilizó la técnica de FRAP (**Figura 7A**). Partículas sólidas como los cristales muestran mayor rigidez y por lo tanto la difusión de moléculas en estas estructuras es lenta o nula [100]. Las partículas wt (PH-WT-GFP) al ser un cristal, no recuperaron la fluorescencia después de fotoblanquear la GFP. Sin embargo, las NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP morfológicamente diferentes a las wt mostraron recuperación de la fluorescencia en un 5% aproximadamente **Figura 7B**.

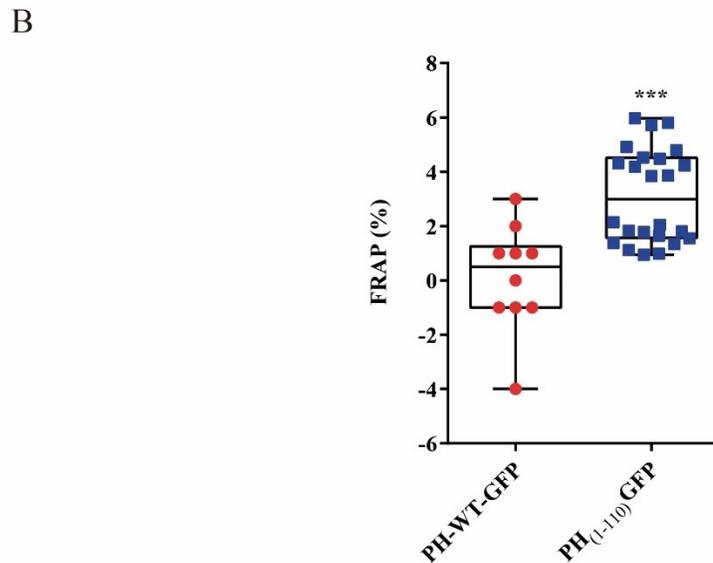
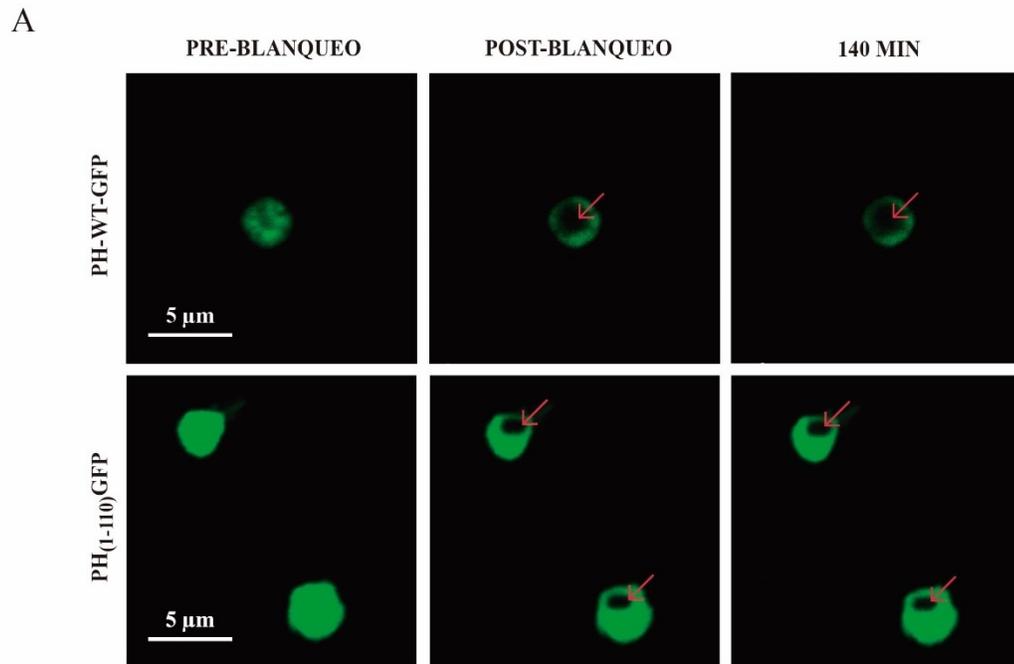


Figura 7. Recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo (FRAP) en NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP y PH-WT-GFP. A) Las imágenes de microscopia confocal muestran la secuencia de FRAP. En el extremo izquierdo se muestran las partículas PH-WT-GFP (arriba) y las nanopartículas PH₍₁₋₁₁₀₎GFP (abajo). En el centro se muestran las partículas después del fotoblanqueo y con una flecha roja se señala la zona del fotoblanqueo. En el extremo derecho se muestran imágenes 140 minutos después de iniciado el FRAP. B) Porcentaje de fluorescencia recuperada después del fotoblanqueo. Las barras de error indican la media \pm SD; n = 10 para PH-WT-GFP; n = 14 para PH₍₁₋₁₁₀₎GFP. *** $p < 0.01$ (t de Student de dos colas).

7.4 Una segunda inmunización con NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP mejora la respuesta de anticuerpos

Se evaluaron una y dos dosis de dos concentraciones (25 y 100 µg) de NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP en ratones siguiendo el esquema de la **Figura 8A**, se eligieron estas dosis porque se había reportado que con dosis de 10 µg la respuesta era poca y corta duración [101]. Al evaluar una sola dosis (**Figura 8B**) con las concentraciones indicadas, se observó una respuesta duradera por más de 24 semanas, con ligero incremento en la respuesta con 100 µg, pero sin diferencia estadística ($p < 0.001$). Al evaluar dos dosis (**Figura 8C**), se observó el mismo comportamiento que con una sola dosis. Los dos tratamientos, 25 µg y 100 µg generaron la misma respuesta de anticuerpos durante las 24 semanas, pero con dos dosis la respuesta se establece desde la semana 4 ($p < 0.001$), en comparación con la respuesta de una sola dosis que va incrementando gradualmente. La respuesta resultó ser igual entre 25 y 100 µg, pero mejor con 2 dosis por lo que se decidió realizar los siguientes experimentos con 25 µg x 2 dosis de NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP.

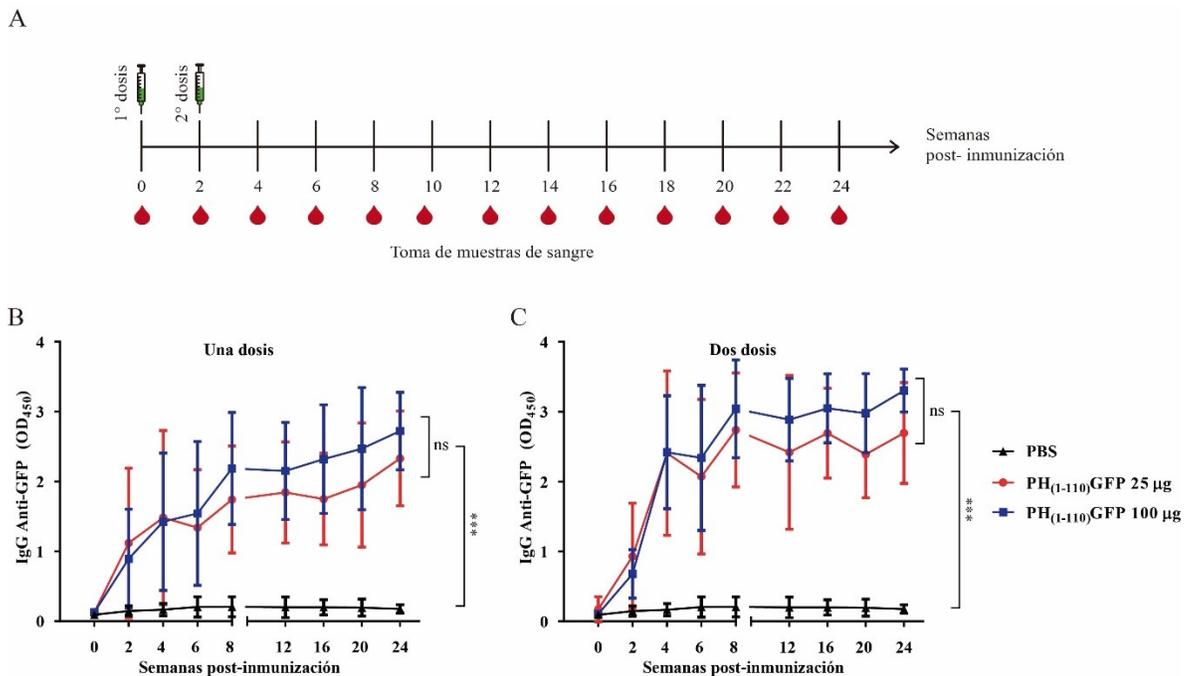


Figura 8. Comparación de la respuesta de anticuerpos de NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP en concentraciones y dosis diferentes. A) Se muestra el esquema de inmunización y de toma

de muestras de sangre. **B)** Evaluación de la respuesta de anticuerpos específicos a la GFP inducida por una dosis de 25 μg o de 100 μg de PH₍₁₋₁₁₀₎GFP. **C)** Comparación de la respuesta de anticuerpos IgG contra GFP producidos por dos dosis de 25 o de 100 μg de PH₍₁₋₁₁₀₎GFP. La barra de error indica la media \pm SD (n = 5). *** $p < 0.001$; ns = no significativo. (ANOVA de dos vías, Tukey post-test).

7.5 Las NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP muestran el mismo efecto adyuvante que el hidróxido de aluminio (alum)

Se comparó la respuesta inmune humoral generada por NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP y la GFP administradas con y sin adyuvante siguiendo el esquema de inmunización descrito en la **Figura 9A**. Las inmunizaciones con adyuvantes de ambos antígenos provocaron respuestas inmunes por anticuerpos similares, mientras que la respuesta inmune de NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP sin adyuvante en la semana 16 alcanzó la misma respuesta que los tratamientos con adyuvante. Por otro lado, la GFP soluble mostró ser una proteína poco inmunogénica con niveles de anticuerpos bajos y de corta duración (**Figura 9B**). De manera sorprendente el efecto adyuvante de PH₍₁₋₁₁₀₎GFP se igualó al de hidróxido de aluminio que, si bien no es de los más potentes, sí es el principal adyuvante en las vacunas de uso en humanos.

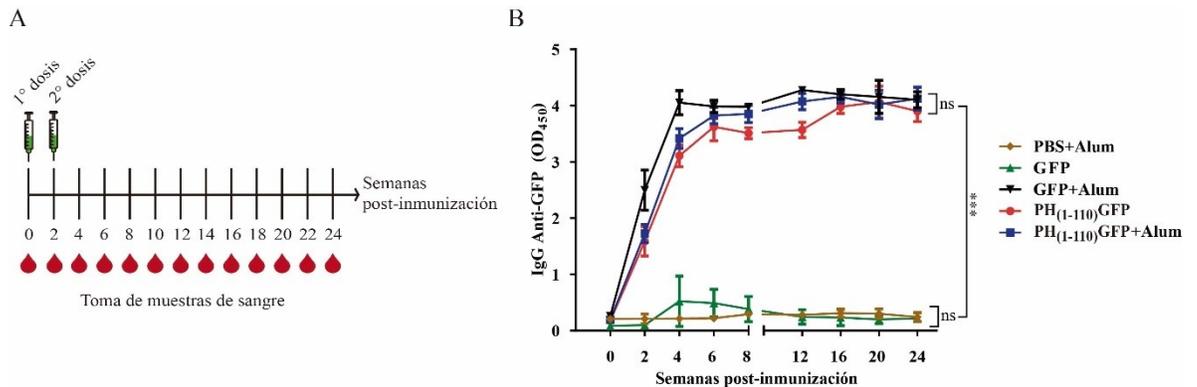


Figura 9. Comparación de la respuesta de anticuerpos producida por NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP y GFP soluble. **A)** Se muestra el esquema de inmunización de ratones y los tiempos de toma de muestra de sangre. **B)** Evaluación de la respuesta de anticuerpos contra GFP en ratones inmunizados con PH₍₁₋₁₁₀₎GFP y GFP soluble con y sin adyuvante. La barra de error indica la media \pm SD (n = 5). *** $p < 0.001$; ns = no significativo. (ANOVA de dos vías, Tukey post-test).

Para comparar a detalle la respuesta de anticuerpos inducida por los diferentes tratamientos con y sin adyuvante, se titularon los anticuerpos en tres diferentes tiempos. La primera titulación fue en la semana 4 (**Figura 10A**) una vez reflejada la respuesta de las dos inmunizaciones, en la que se observó un título de anticuerpos de 1:12800 alcanzado por las NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP sin adyuvante. Para la semana 14 (**Figura 10B**) se registró el título más alto alcanzado por los anticuerpos generados por NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP y para la semana 24 (**Figura 10C**) el título observado fue de 1:6400 para el tratamiento con NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP sin adyuvante. Es clara una respuesta mayor en los tratamientos con adyuvante a lo largo de todo el tiempo, sin embargo, es de resaltar el efecto adyuvante que tienen las NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP cuyo efecto se extiende al menos por 24 semanas y que al igual que el hidróxido de aluminio (un adyuvante estandarizado) en ese punto empieza a disminuir el título de anticuerpos.

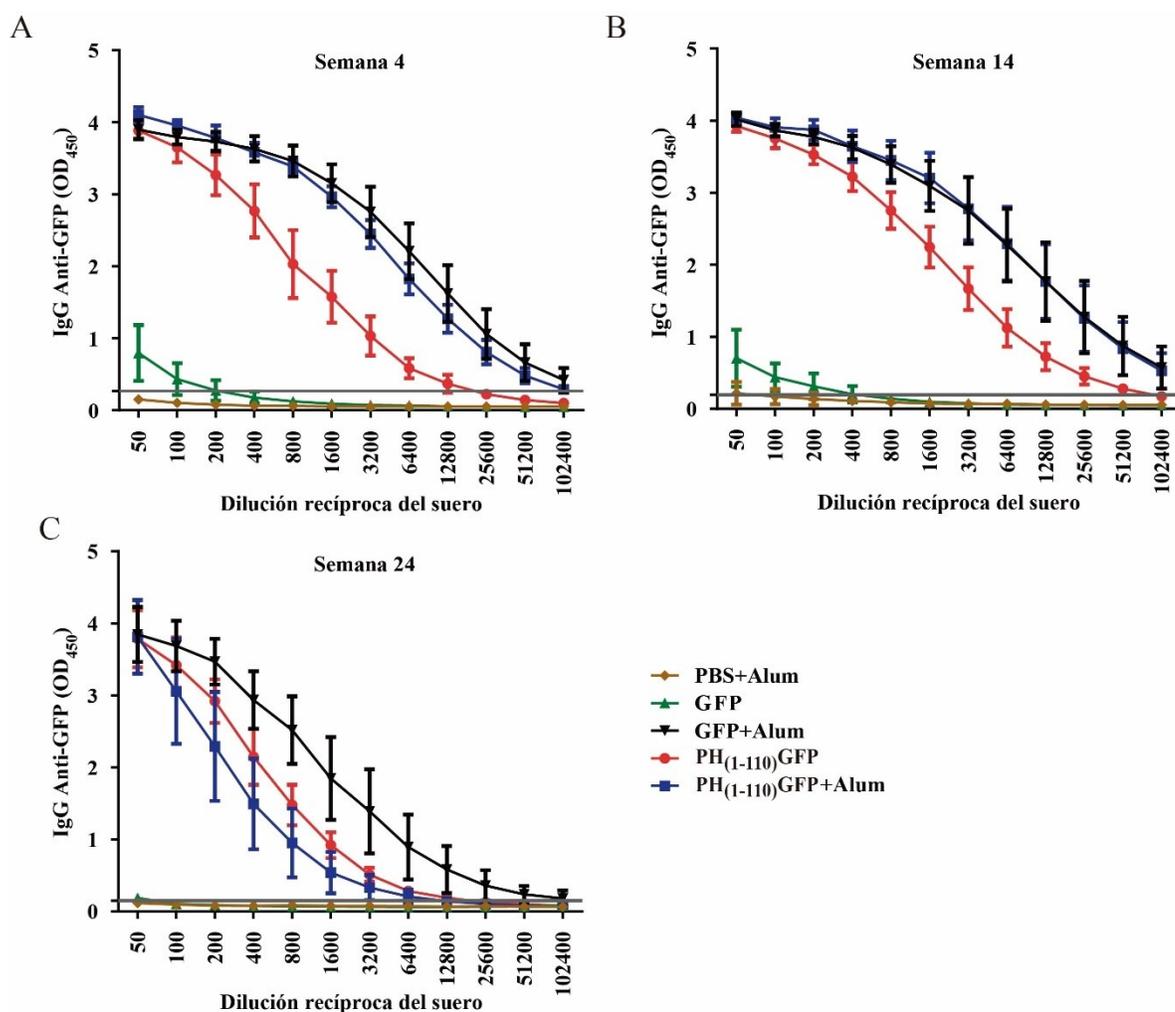


Figura 10. Titulación de anticuerpos producidos por NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP y GFP con y sin adyuvante. A) Se muestran los títulos de anticuerpos alcanzados a la semana 4 post-immunización. B) Títulos de anticuerpos alcanzados a la semana 14. C) Títulos de anticuerpos que permanecen hasta la semana 24. La línea gris muestra el punto de corte para determinar el título de anticuerpos. Dilución doble seriada. La barra de error indica la media \pm SD (n = 5).

7.6 La inmunización con NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP responde al desafío contra GFP

A los ratones, cuyos títulos de anticuerpos específicos a GFP se habían determinado, se les realizó un experimento tipo desafío para tener una aproximación a la respuesta inmunológica de memoria [102, 103]. Como se observó en el experimento previo, los niveles de anticuerpos en sangre disminuyeron en la semana 24 razón por la cual en este

punto se realizó un experimento de desafío que consistió en lo siguiente: a todos los ratones, sin importar el tratamiento administrado previamente, se les inyectó GFP soluble (una quinta parte del tratamiento previo) libre de PH₍₁₋₁₁₀₎ y de adyuvante. Se tomaron muestras de sangre en los días 4, 7, 14 y 21 (**Figura 11A**). La respuesta inmunológica de memoria es una respuesta adaptativa más rápida, específica y eficiente contra un patógeno con el que ya tuvo contacto previo un individuo. Por lo descrito antes, se esperaba que los grupos de ratones que habían tenido un primer contacto con GFP y que habían generado una respuesta inmune, es decir, que habían producido anticuerpos contra la GFP responderían produciendo anticuerpos de manera más rápida que la respuesta primaria, títulos más altos y por un mayor tiempo. Lo que se observó fue, que en el día 7 post desafío, todos los grupos inmunizados con GFP más adyuvante y el grupo de NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP sin adyuvante incrementaron los niveles de anticuerpos en menor tiempo que en la primera exposición, a diferencia del grupo que se inmunizó con la GFP soluble sin adyuvante, el cual se mantuvo con niveles bajos de anticuerpos anti GFP (**Figura 11B**). Este resultado sugiere que las NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP podrían generar respuesta inmunológica de memoria dirigida a la GFP, además del efecto adyuvante y de la respuesta inmune de larga duración.

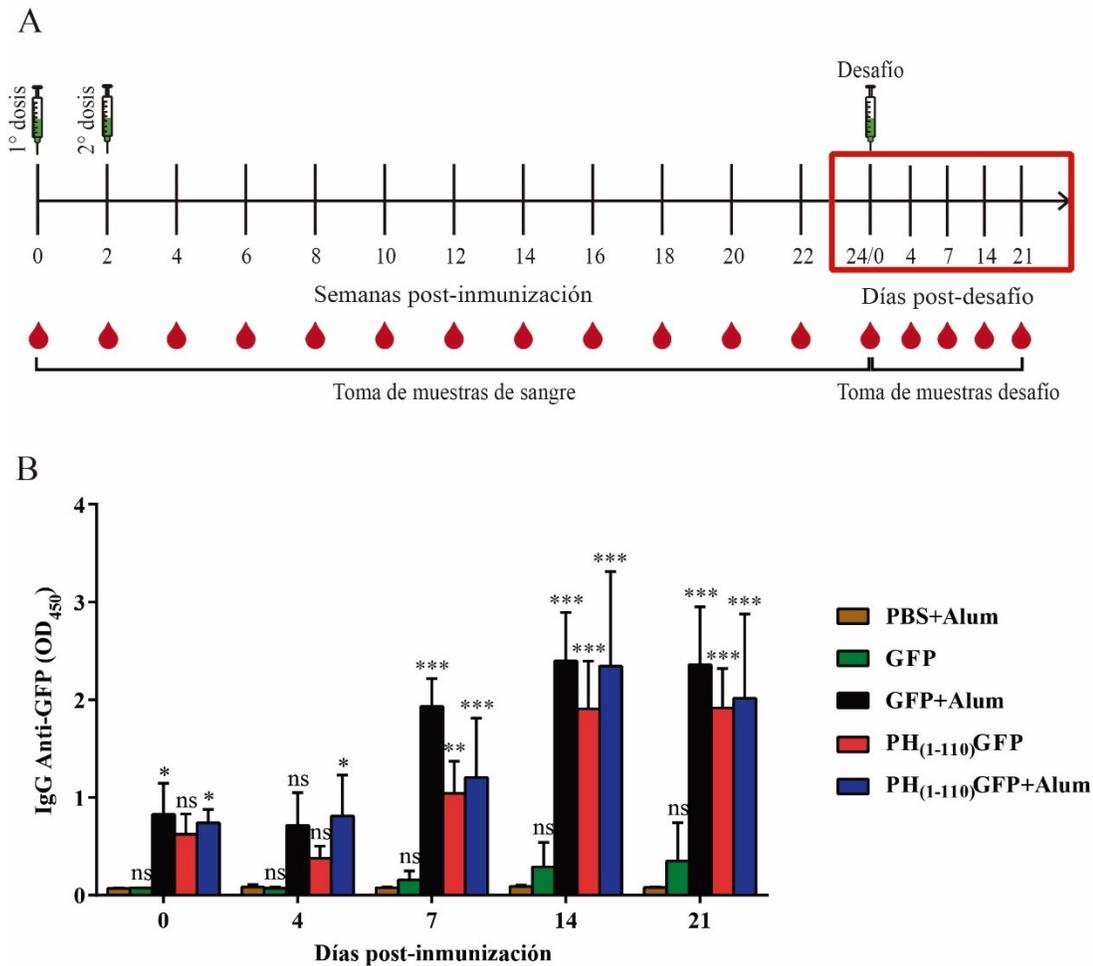


Figura 11. Experimento tipo desafío contra GFP en ratones. A) Se muestra el esquema de inmunización, “desafío” y toma de muestras de sangre. Cuadro rojo muestra el tiempo de la evaluación de la memoria inmunológica. **B)** Se observa la respuesta de anticuerpos generada después de la reinmunización con GFP soluble, la respuesta se evaluó por 21 días. Todos los grupos fueron comparados contra el grupo de PBS + Alum. La barra de erros indica la media \pm SD (n = 5). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns = no significativo (ANOVA de dos vías con Dunnett post-tests).

7.7 La NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP estimulan respuesta celular de linfocitos T

Una vez demostrada la respuesta inmune humoral generada por NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP, se evaluó el tipo de respuesta celular. En un primer acercamiento, fue evaluando el perfil de subtipos de IgG para inferir si se produce respuesta celular, humoral o ambas [96]. Se evaluaron sueros de la semana 8 del experimento descrito en la sección 7.4. Se eligió la

semana 8 porque se observó que la respuesta de anticuerpos en este punto se mantiene. En los sueros se examinaron los subtipos IgG2a e IgG2b (**Figura 12A y 12B respectivamente**) como indicadores de la respuesta celular y al subtipo IgG1 como indicador de la respuesta humoral (**Figura 12C**). En los ratones inmunizados con GFP soluble sin adyuvante no se observan ninguno de estos subtipos de IgG, pero la respuesta de los tres subtipos se comporta igual en los grupos inmunizados con adyuvante y en el grupo NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP. Otro hallazgo importante es que los subtipos IgG2a e IgG2b son estimulados en menor medida que el subtipo IgG1 tanto con hidróxido de aluminio como con PH₍₁₋₁₁₎GFP lo que nos indica que es mayormente estimulada la respuesta humoral, pero también existe respuesta celular en menor medida, lo que se comprobó obteniendo la relación IgG2a/IgG1 (**Figura 12D**).

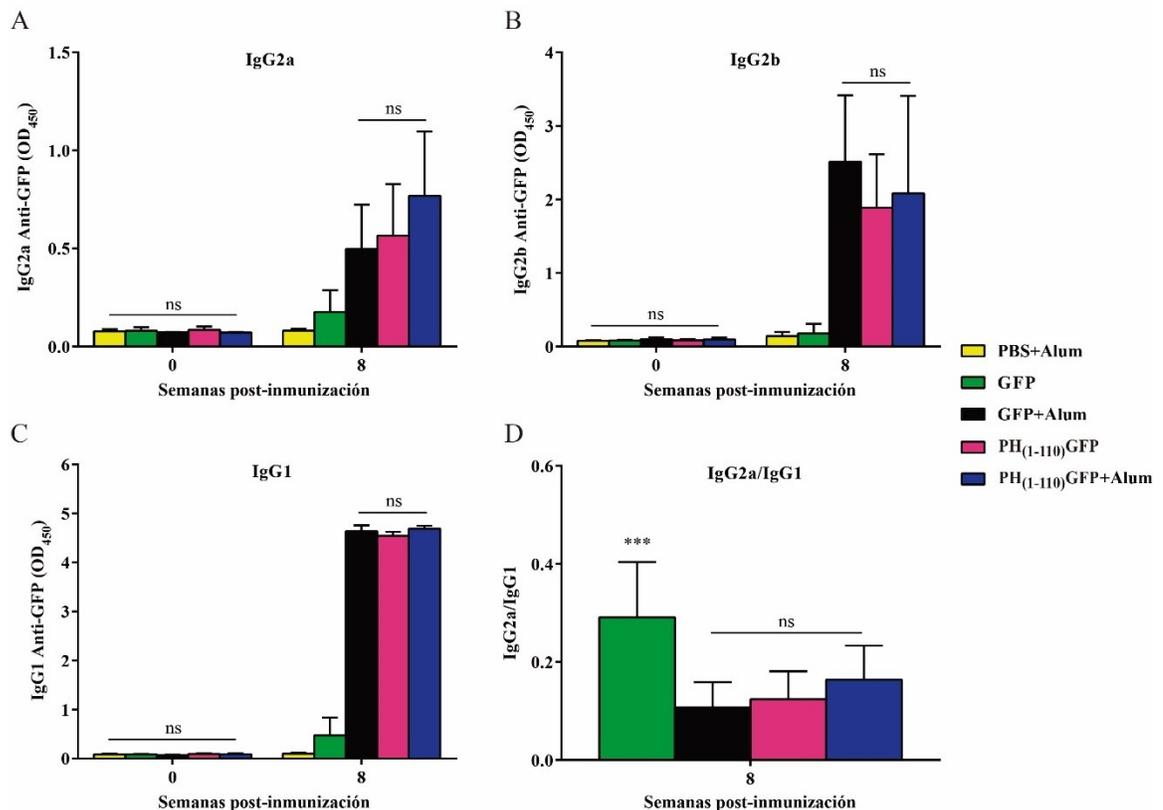
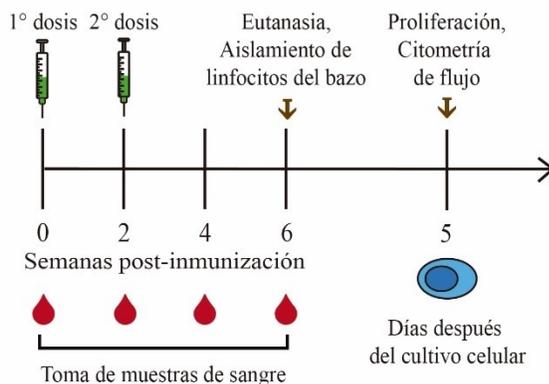


Figura 12. Respuesta humoral y celular determinada por el perfil de inmunoglobulinas. A) Evaluación de IgG2a inmunoglobulina estimulada mayormente en respuesta celular. **B)** Evaluación de IgG2b al igual que la IgG2a está presente en respuesta celular. **C)** Evaluación de IgG21 inmunoglobulina presente en la respuesta humoral. **D)**

Medición de la razón IgG2a/IgG1 para determinar la inclinación de la respuesta humoral o celular. La barra de error indica la media \pm SD (n = 5). *** $p < 0.001$; ns = no significativo. (ANOVA de dos vías con Tukey post-tests).

Para corroborar el hallazgo que sugería respuesta inmunológica celular y humoral inducida por las NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP, se realizó un ensayo de proliferación de linfocitos T y su posterior evaluación por citometría de flujo. Para realizar este experimento, se siguió el esquema de inmunización, eutanasia y disección de bazos de ratones, así como su posterior cultivo e inducción de los linfocitos como se indica en la **Figura 13A**. Una vez desarrollado el análisis de proliferación se encontró que los grupos de ratones inmunizados con las NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP con y sin adyuvante tuvieron el mayor porcentaje de proliferación, pero solo cuando se estimularon a los linfocitos con NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP. Lo que se esperaba era que solo todos los grupos que vieron a la GFP con adyuvante o con PH₍₁₋₁₁₀₎GFP fueran estimulados con la GFP soluble, sin embargo, no fue así, solo el grupo de ratones inmunizados con GFP soluble respondió a la GFP soluble, sin embargo, es un dato que se tiene que corroborar por la SD muy grande (**Figura 13B**). Lo que se puede inferir con estos resultados es que la NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP sí estimulan la proliferación de linfocito, lo que permite concluir que la respuesta inmune generada por NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP es humoral y celular. Un estudio evaluando las citocinas y poblaciones celulares también ayudaría a confirmar la respuesta celular.

A



B

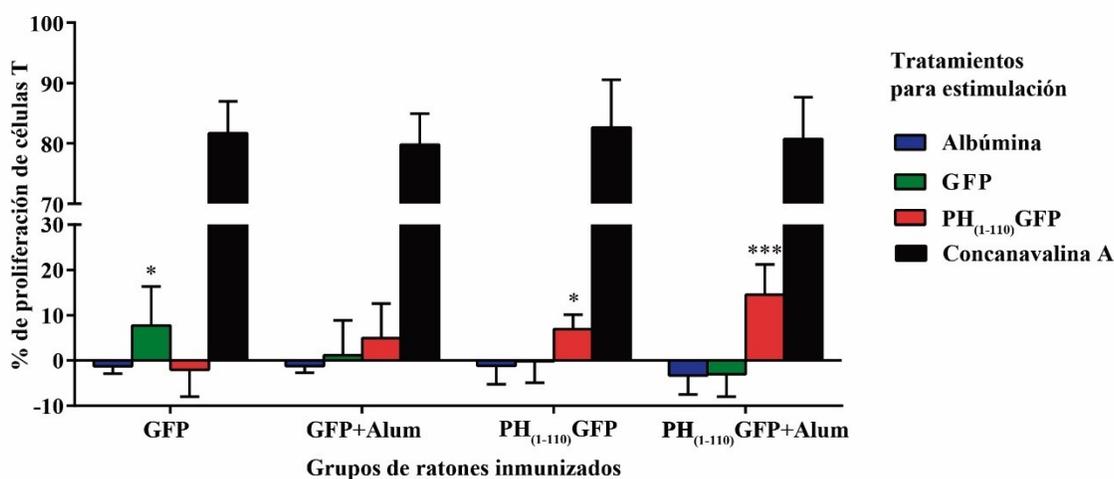


Figura 13. Inducción de la proliferación de linfocitos T. A) Se muestra el esquema de inmunización y la línea de tiempo de la proliferación. B) Se muestra el porcentaje de proliferación de linfocitos T (CD 3⁺) inducida por tres tratamientos: GFP soluble, Albúmina (antígeno no relacionado) y NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP. Se normalizaron todos los grupos con respecto al grupo de PBS + Alum (no se muestra). Como control de estimulación se utilizó Concanavalina A. La barra de error indica la media \pm SD (n = 3). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (ANOVA de dos vías y Dunnett post-tests).

7.8 Las NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP son estables a temperatura ambiente

Uno de los hallazgos más importantes de la plataforma para el desarrollo de nuevas vacunas que propone este trabajo se dio evaluando la estabilidad de las NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP. La termoestabilidad se evaluó conservando alícuotas de partículas PH₍₁₋₁₁₀₎GFP en diferentes condiciones de temperatura y humedad e inmunizando ratones como se describe en la sección materiales y métodos. Con las partículas que permanecieron almacenadas

durante un mes en las diferentes condiciones de temperatura se obtuvieron las mismas respuestas de anticuerpos como se esperaba (**Figura 14A**) y después de 3 meses seguían montando la misma respuesta las partículas congeladas, las refrigeradas y las que permanecieron en temperatura ambiente (**Figura 14B**). Sin embargo, en el 6° mes las partículas que permanecieron a 4 °C montaron una respuesta menor de anticuerpos, pero las partículas a temperatura ambiente generaron el mismo nivel de anticuerpos que las partículas de referencia que permanecieron en congelación (**Figura 14C**). Para la última evaluación, al año de conservar las partículas en las diferentes condiciones se obtuvo un resultado relevante, las NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP que previamente se habían deshidratado y conservado a temperatura ambiente fue el único tratamiento que mostró la misma respuesta de anticuerpos que las partículas congeladas (**Figura 14D**). Las NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP deshidratadas, conservan la propiedad natural de las poliedras para mantener viables por años a los virus que se ocluyen dentro de ellas. La termoestabilidad es una característica que se busca en las vacunas de nueva generación.

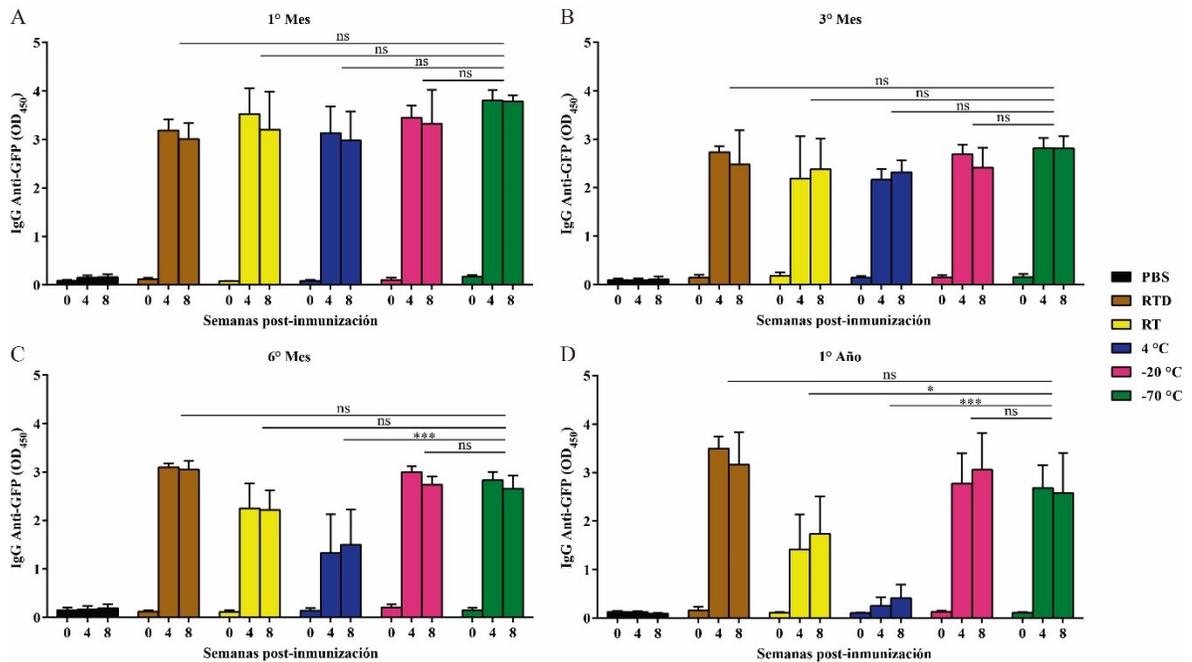


Figura 14. Termoestabilidad de NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP en diversas condiciones de temperatura . A) Gráfica que muestra la respuesta de anticuerpos producidos NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP sometidas durante un mes a diferentes condiciones de temperatura y humedad. **B)**

Evaluación de respuesta de anticuerpos 3 meses después de mantener las NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP a diferentes condiciones ambientales. **C)** Se muestra la respuesta de anticuerpos producidos NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP sometidas durante 6 meses a diferentes condiciones de temperatura y humedad. **D)** Evaluación de 1 año de la estabilidad de NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP. Todos los grupos fueron comparados contra el grupo de ratones inmunizados con NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP que permanecieron a -70 °C. RTD = Temperatura ambiente deshidratadas, RT = Temperatura ambiente. Las barras de error indican \pm SD (n = 5). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns = no significativo. (ANOVA de dos vías y Dunnett post-tests).

7.9 El tamaño de las partículas PH₍₁₋₁₁₀₎GFP no modifica la respuesta inmune

En la literatura hay evidencia de que el tamaño de partículas afecta el nivel de respuesta inmune, algunos estudios sugieren que partículas más pequeñas mejoran la respuesta, por lo anterior se decidió evaluar la respuesta inmune generada por partículas PH₍₁₋₁₁₀₎GFP de diferentes tamaños. Anteriormente se observó que el sistema de poliedrina (PH₁₋₁₁₀) generaba partículas de tamaños heterogéneos, que abarcan un gran rango de tamaños que van de micras a nanómetros. Como era difícil separar tamaño por tamaño, se utilizaron gradientes de sacarosa para hacer una separación gruesa, es decir, separar rangos de tamaños como se muestra en la **Figura 15A**. Cada fracción obtenida en el gradiente de sacarosa se corrió en SDS-PAGE y se tiñó con azul de Coomassie con lo que se observó que cada fracción contenía la proteína de fusión PH₍₁₋₁₁₀₎GFP (**Figura 15A**) y para corroborar la presencia de nano y micropartículas cada gradiente se observó en microscopia confocal, en cada micrografía se observan partículas (**Figura 15B**). Con las diferentes fracciones de partículas PH₍₁₋₁₁₀₎GFP obtenidos en los gradientes, se inmunizaron ratones, incluyendo un grupo con la mezcla de todas las partículas en la misma proporción. Lo que se observó fue que en este sistema no se afectó la respuesta utilizando partículas pequeñas o grandes (**Figura 15C**).

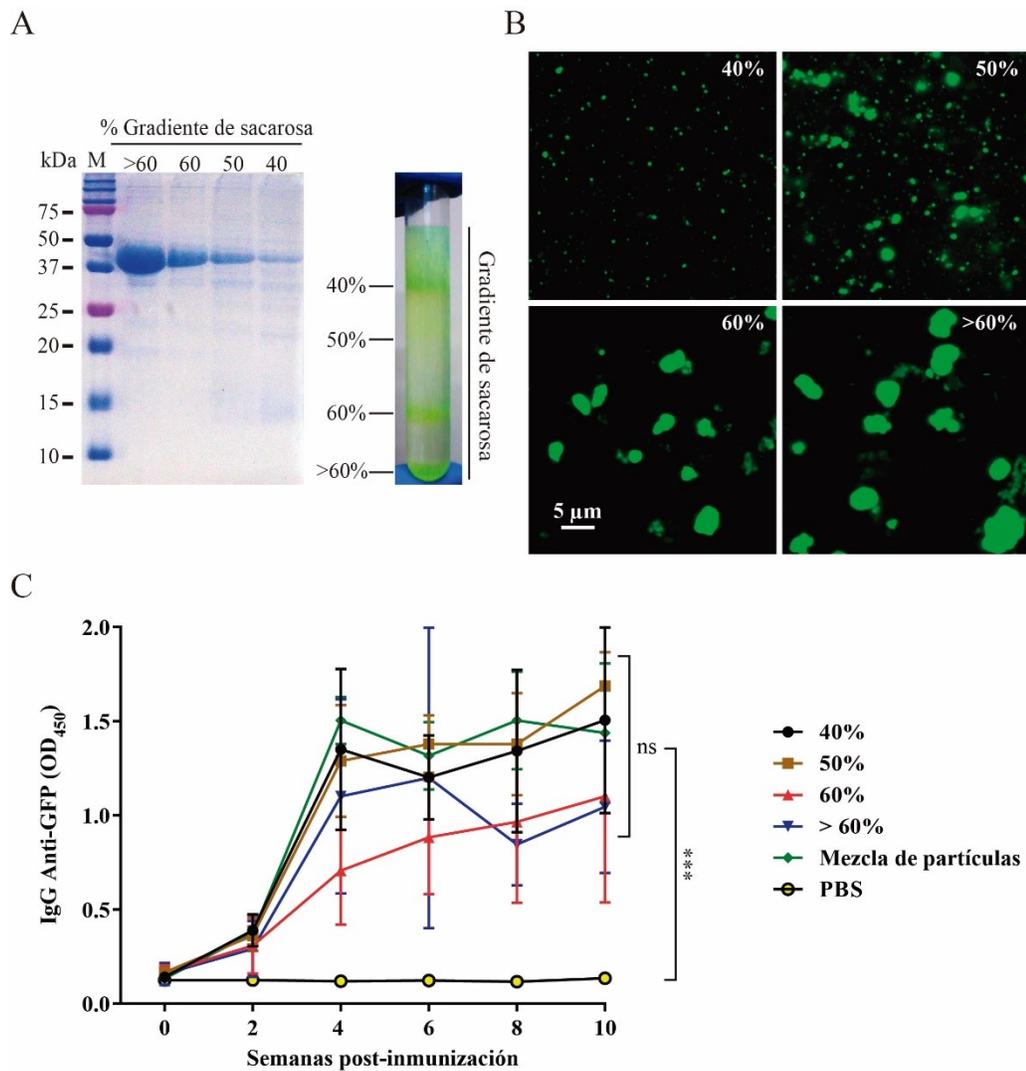


Figura 15. Respuesta de anticuerpos por partículas PH₍₁₋₁₁₀₎GFP de diferentes tamaños. **A)** Se muestra la separación de partículas PH₍₁₋₁₁₀₎GFP por gradientes de sacarosa (derecha). En el gel de SDS-PAGE, se observa la misma pureza de la proteína que forma partículas PH₍₁₋₁₁₀₎GFP no importando el tamaño (izquierda). **B)** La microscopía confocal confirma partículas de diferente tamaño (nano y micropartículas) en cada gradiente de sacarosa. **C)** Inmunización de ratones con las partículas PH₍₁₋₁₁₀₎GFP obtenida en los diferentes gradientes. Todos los grupos se compararon contra la mezcla de partículas. La dilución utilizada para los sueros fue de 1:400. Barra de error indica la media \pm SD (n = 5). *** $p < 0.001$, ns = no significativo. (ANOVA de dos vías, Dunnett post-tests).

8. Discusión

Desde sus orígenes el sistema de expresión de baculovirus mostró flexibilidad y versatilidad, al principio solo como método para controlar poblaciones de insecto, después como sistema de despliegue de proteínas y ahora como sistema de expresión de proteínas acopladas a cuerpos de oclusión por su interesante propiedad de autoensamblaje [76]. Como se mencionó en la revisión bibliográfica, estos cuerpos de oclusión también conocidos como poliedras, les permite a los baculovirus permanecer viables en la naturaleza por años, sin importar los cambios de temperatura, humedad, desecación e incluso son resistentes a degradación por algunas proteasas [75, 77].

En esta investigación nosotros decidimos tomar las características naturales de la poliedrina y la poliedra para proponer una plataforma para generar vacunas de nueva generación, que estimulen una respuesta inmune robusta y con la característica de termoestabilidad. Lo primero que se hizo fue obtener partículas recombinantes, como estaba reportado anteriormente la poliedrina tiene la capacidad de incorporar proteínas extrañas [73, 89, 90] lo que efectivamente se observó en las partículas que obtuvimos (**Figuras 3 y 5**). Sin embargo, nosotros utilizamos la metodología descrita en nuestro laboratorio [73], fusionamos el gen de la proteína verde fluorescente al C-terminal de la secuencia 1-110 aa de la poliedrina, con lo que obtuvimos las partículas PH₍₁₋₁₁₀₎GFP.

De manera interesante las partículas que se obtuvieron con la proteína de fusión PH₍₁₋₁₁₀₎GFP fueron de tamaños variados pero en su mayoría en el rango nanométrico y un porcentaje menor de tamaño superior a la micra, además de tener una forma irregular (**Figuras 5 y 6**), en comparación con los OB o poliedras wt que tienen formas regulares y que su tamaño se encuentra por arriba de los 600 nm y que alcanzan los 2µm [77]. Un punto importante en esta metodología fue que la GFP sirvió para dos objetivos, el primero, facilitar la visualización de las nanopartículas y el segundo, usarlo como modelo antigénico, en su forma de partícula.

Además de la caracterización morfológica que realizamos, también pudimos contribuir a la descripción física de las partículas. Se sabe que la proteína poliedrina wt forma cristales [83, 84], pero no se sabía si las partículas que forman las poliedrinas recombinantes conservaban ese estado físico. El experimento de FRAP nos permitió descubrir que la estructura de cristal no se conserva en las partículas PH₍₁₋₁₁₀₎GFP. Las partículas fluorescentes se sometieron a fotoblaqueo logrando una recuperación de la fluorescencia del ~5% en 140 min, a pesar que la recuperación fue lenta esta no se observó en las partículas wt y se ha observado que en otros cristales no se recuperan la fluorescencia en experimentos de FRAP [100, 104].

Una vez producidas las partículas el siguiente paso fue purificarlas. La purificación de los antígenos es una parte muy importante en la producción de las vacunas, es uno de los puntos críticos que se evalúan durante todo el proceso para poder ser aprobadas [11]. Todas las vacunas llevan cierto porcentaje de residuos tanto del sistema de producción como de purificación, esto aumenta el costo y el tiempo para obtener un antígeno relativamente puro [3], con el sistema de poliedrina PH₍₁₋₁₁₀₎ se observó que el proceso es fácil, solo necesitamos lavados con PBS y centrifugación para obtener partículas con un 80% de pureza (**Figuras 3, 4 y 15A**). Es cierto que hay antígenos con pureza superior, pero para ser una *prueba de concepto* las nanopartículas de poliedrina recombinante se purifican fácilmente y aún es una característica que puede mejorarse.

Una vez comprobada la formación de nanopartículas con el antígeno de interés (GFP) y realizada la purificación, se evaluó la respuesta inmune que generaban después de inmunizar ratones. Uno de los hallazgos más importantes que arrojó el proyecto fue la descripción del efecto adyuvante que tiene la poliedrina (PH₍₁₋₁₁₀₎). La GFP por sí sola no es capaz de montar una respuesta inmune, por la que tiene que ser administrada con algún adyuvante. En este experimento utilizamos como referencia la respuesta inmune que generaba la GFP inyectada con hidróxido de aluminio, este adyuvante es de los únicos que está permitido para uso en humanos y se caracteriza por causar fuerte inflamación, lo que provoca la incorporación de diferentes células al sitio de inmunización, logrando así un

mayor efecto en la producción de anticuerpos por parte de las células plasmáticas [105–107]. La comparación entre el hidróxido de aluminio y la PH₍₁₋₁₁₀₎ nos permitió entender el efecto o beneficio de ésta última sobre el antígeno de interés. Las NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP al igual que el hidróxido de aluminio estimularon la producción de anticuerpos específicos contra GFP y se alcanzaron títulos elevados de IgG (**Figuras 9 y 10**) y a diferencia del hidróxido de aluminio se había descrito anteriormente que la PH₍₁₋₁₁₀₎ genera respuesta inmune a pesar de no causar inflamación, lo cual es menos doloroso o invasivo [91]. Además, la respuesta de anticuerpos se mantuvo por más de 24 semanas y con una concentración baja de proteína, si tomamos en cuenta que en los 25 µg (2 dosis) que se inmunizaron la relación PH₍₁₋₁₁₀₎:GFP es 1:1, no son 25 µg totales de GFP, en comparación del tratamiento GFP+Alum que sí llevaba 25 µg totales de GFP.

La memoria inmunológica también tiene un papel importante en la respuesta frente a patógenos y es uno de los objetivos que se busca con la vacunación. La memoria inmunológica está dada por células B y T de memoria, que reconocen antígenos después de tiempo en que se tuvo el primer contacto, haciendo efectiva la protección contra el mismo [108]. Con el experimento de desafío se propone que las NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP, promueven memoria inmunológica en contra de la GFP incorporada a ellas, el efecto de memoria se evaluó 6 meses después de la primera inmunización con las nanopartículas. Como se esperaba las nanopartículas y la GFP con adyuvante mostraron el mismo efecto inmunológico que se ha reportado en el hidróxido de aluminio [109], de manera interesante las NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP que se aplicaron sin adyuvante también mostraron este efecto contra la GFP soluble. Sin importar que en un principio el sistema inmune haya visto a la GFP en el contexto de las nanopartículas, la respuesta es dirigida a la GFP y al verla de manera sola el sistema inmune puede reaccionar contra ella (**Figura 11**). Otro experimento que ayudaría a confirmar la respuesta de memoria inmunológica sería la evaluación de poblaciones celulares para identificar células memoria por medio de marcadores de superficie [110, 111].

En las vacunas siempre se busca que induzcan una respuesta mixta, es decir, que estimulen la producción de anticuerpos (también denominada respuesta Th2) y que intervengan diferentes poblaciones de células inmunitarias (también denominada respuesta Th1) para que la respuesta sea robusta y asegure la protección [3, 112]. El perfil de anticuerpos IgG reveló que la respuesta inducida por nanopartículas PH₍₁₋₁₁₀₎GFP era mixta, las inmunoglobulinas IgG2a e IgG2b indicadores de respuesta celular y la IgG1 indicador de respuesta humoral estuvieron presentes en la respuesta con PH₍₁₋₁₁₀₎GFP [113, 114], pero la relación IgG2a/IgG1 indicó mayor tendencia a la respuesta humoral (**Figura 12**). Por el resultado anterior fue preciso realizar un ensayo de proliferación celular, específicamente de linfocitos T, su efecto se aprecia mucho en infecciones de patógenos intracelulares [115, 116]. Los resultados obtenidos nos indican que los grupos que fueron inmunizados con las nanopartículas PH₍₁₋₁₁₀₎GFP, sí estimulan la proliferación de linfocitos T, pero este efecto estimulador solo se observó cuando los linfocitos de ratones inmunizados con PH₍₁₋₁₁₀₎GFP sin adyuvante, vieron a la GFP en el contexto de la poliedrina. El grupo inmunizado con PH₍₁₋₁₁₀₎GFP + adyuvante de Freud fue el que estimuló la proliferación en mayor proporción (**Figura 13**) como se ha observado en adyuvantes tipo emulsión [117]. Un resultado para el que no tenemos un acercamiento claro es la proliferación que aparentemente se genera en linfocitos de ratones inmunizados con GFP libre al hacer estimulación con GFP, ya que, en los diferentes ensayos, no muestra respuesta inmune significativa. De esta manera se sugiere realizar otros estudios como la medición de citocinas y evaluación de poblaciones celulares para complementar la información [115].

Como se planteó en la introducción, las vacunas que se utilizan de manera normal tanto para uso humano como animal requieren mantenerse en refrigeración desde su producción, transporte, almacenamiento hasta su aplicación, esto representa más de la mitad del costo de una vacuna [58, 118]. Para resolver el problema de la estabilidad de las vacunas varios grupos de trabajo han implementado sistemas basados en biomateriales; ejemplos de estos son las nanopartículas con trímeros de hemaglutinina que mostraron estabilidad a temperatura ambiente por cerca de 4 meses [119]. Otra propuesta son nanopartículas híbridas de lípidos con PLGA donde han tratado de hacer más estables a los

liposomas para mantener protegidos los cargos [120]. Uno de los sistemas que mayor estabilidad ha mostrado son los parches de microagujas en los que se han encapsulado subunidades del virus de influenza con formulaciones de carbohidratos y después de 24 meses de mantenerlos a temperatura ambiente, siguen manteniendo su actividad [121], sin embargo, el proceso para generar este tipo de parches es complejo y los costos podrían no reducirse significativamente. Con el sistema propuesto en este proyecto el hallazgo más importante y contribución para la vacunación es la termoestabilidad que las partículas de poliedrina PH₍₁₋₁₁₀₎ comparte con el antígeno fusionado a ella. Las partículas PH₍₁₋₁₁₀₎GFP conservaron su función, montaron una respuesta inmune después de permanecer 12 meses a temperatura ambiente, pero más interesante aún fue que solo se tuvieron que deshidratar (**Figura 14**), no necesitaron un procedimiento laborioso como la liofilización que además no es un procedimiento que se pueda utilizar en cualquier antígeno [11]. Tampoco se necesitó una formulación especial para mantener a los antígenos dentro de las nanopartículas, ya que el antígeno y las nanopartículas son una sola entidad.

Otro resultado interesante es que las NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP tiene el mismo efecto sin importar el tamaño de la partícula que se administre. En muchos trabajos se ha demostrado que partículas de menor tamaño mejoran la presentación de antígenos y por lo tanto se ve favorecida la respuesta inmune. Nanopartículas de quitosano y PLGA con tamaños menores a 500 nm han mostrado un mejoramiento en la fagocitosis y presentación de antígenos, así como en la producción de anticuerpos [122, 123], pero también se ha demostrado que partículas de PLGA mayores de 5 micras mejoran la respuesta inmune en administración pulmonar [124] de la misma manera, partículas de PLA mayores a 2 micras mejoraron la respuesta humoral, mientras las de menor tamaño mostraron mayor respuesta celular [125]. En el caso de las NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP se observó el mismo efecto en la producción de anticuerpos con partículas grandes y pequeñas (**Figura 15**). Pero también, no obstante, el tipo de respuesta dependerá también de la forma de las partículas y de la vía de administración [126].

Finalmente, este estudio comprueba la propiedad del sistema de partículas PH₍₁₋₁₁₀₎ para ser usado como acarreador de antígenos. Previamente reportamos la fusión de la proteína ORF2 del circovirus porcino tipo 2 al péptido PH₍₁₋₁₁₀₎. Se obtuvieron partículas y al ser inmunizados ratones se detectaron anticuerpos específicos contra el ORF2 [74]. Ahora con la fusión de GFP a PH₍₁₋₁₁₀₎ y caracterizar la respuesta inmunológica, demostramos la flexibilidad que este sistema tiene para ser usado con diversas proteínas.

9. Conclusión

El fragmento de la poliedrina (1-110) es un fuerte candidato como biomaterial para un sistema nuevo de vacunas, muestra respuesta inmune específica contra el antígeno de interés, de larga duración, genera memoria inmunológica y estimula las respuestas celular y humoral. Además, PH₍₁₋₁₁₀₎ tiene efecto adyuvante que mejora e incrementa la respuesta. Por otro lado, este biomaterial contribuye a solucionar la poca termoestabilidad de las vacunas actuales, lo que permitiría una mejor distribución y el acceso a vacunas por cualquier sector de la población, sin el riesgo de perder efectividad si se rompe la cadena fría. También ofrece una plataforma para fusionar otras proteínas o péptidos recombinantes de interés para formular vacunas, evitando el peligro de la reversión de virulencia de algunos patógenos o la poca respuesta inmune de vacunas recombinantes que requieren adyuvante. Con esta plataforma se podría dar una respuesta rápida a enfermedades emergentes al ser un sistema flexible, sin embargo, aún se deben explorar la fusión de proteínas con características y estructuras diferentes.

10. Perspectivas

Se propone la evaluación de diferentes vías de administración, otro de los desarrollos que busca la OMS es que las vacunas sean de fácil aplicación, por eso se empezó a probar la administración de las NPs PH₍₁₋₁₁₀₎GFP vía oral, los resultados preliminares muestran la producción de anticuerpos, pero con muy bajo título. Y otra vía que se intenta explorar es la nasal.

Otra perspectiva se plantea la creación de una vacuna polivalente. Se proponen tres metodologías para lograr esto, en la primera se generarían nanopartículas por separado con antígenos de diferentes patógenos y se mezclarían antes de la inmunización. En la segunda metodología se infectaría un mismo cultivo con dos o más baculovirus recombinantes, cada uno portando un antígeno diferente y se esperaría que en las células se formaran nanopartículas que compartirán diferentes antígenos, el problema con esta metodología es que la expresión de una proteína puede favorecerse más que otra y quizá no todas las partículas tendrían la misma carga. La última metodología sería hacer una proteína de fusión con péptidos en tándem de diferentes patógenos, sin embargo, la duda sería que se formarían aún las partículas y si los antígenos se plegarían correctamente.

11. Abreviaturas y siglas

aa: Aminoácidos

AcMNPV: *Autographa californica Multiple Nucleopolyhedrovirus*

Alum: Hidróxido de aluminio

APC: Aloficocianina o Allophycocyanin

BCA: Ácido bicinconínico

BmNPV: *Bombyx mori Nucleopolyhedrovirus*

BV: Virus gemados (budded viruses)

CPA: Células Presentadoras de Antígenos

CpG-ODN: CpG-oligodeoxinucleótidos

CT: C-terminal

CFA: Adyuvante Completo de Freund (Complete Freund's adjuvant)

CFSE: 5-(y-6)-Carboxifluoresceína succinimidil éster

CICUAL: Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorios de la UNAM

ConA: Concanavalina A

CPA: Células presentadoras de antígenos

DAPI: 4', 6-diamino-2-phenylindole

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (Enzyme linked immunosorbent assay)

FRAP: Recuperación de la Fluorescencia Después de Fotoblanqueo (Fluorescence Recovery After Photobleaching)

GFP: Proteína Verde Fluorescente Mejorada (Green Fluorescent Protein)

hpi: Horas post infección

HA: Hemaglutinina

HRP: Peroxidasa de rábano (Horseradish peroxidase)

i.m.: Intramuscular

IFA: Adyuvante Incompleto de Freund (Incomplete Freund's adjuvant)

moi: multiplicidad de infección

MPL: 3-O-desacil-4'-monofosforil lípido A

NPs: Nanopartículas

ns: no significativo

NTA: Análisis de seguimiento de nanopartículas (Nanoparticle tracking analysis)

OB: Cuerpos de oclusión (occlusion bodies)

ODV: Virus derivados de oclusión (occlusion-derived viruses)

ON: toda la noche (overnight)

PBS: Solución salina tamponada

pb: Pares de bases

PCV2: circovirus porcino tipo 2

PH: poliedrina

PH₍₁₋₁₁₀₎GFP: 1-110 aa de la poliedrina con GFP fusionada a su C-terminal

PE: Ficoeritrina

PE-CyTM5: Ficoeritrina Cianina 5.1 (Phycoerythrin Cyanin 5.1)

PEG: Polietilenglicol

PLA: Ácido poli-láctico

PLGA: Ácido poli(láctico-co-glicólico)

ROI: Región de interés

rpm: Revoluciones por minuto

RT: Temperatura ambiente (Room temperatura)

RTD: Temperatura ambiente deshidratadas

SAPs: Péptidos de autoagregación (Self-Assembling Peptide)

SAPNs: Nanopartículas de proteínas de autoagregación (Self-Assembling Protein Nanoparticles)

SD: Desviación estándar

SDS-PAGE: Gel de electroforesis de poliacrilamida con SDS

SDS: Dodecilsulfato sódico

SEM: Microscopia Electrónica de Barrido (Scanning electron microscopy)

SICUAE: Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNAM.

SFB: Suero fetal bovino

Sf9: *Spodoptera frugiperda*

TBS: Solución amortiguadora de Tris (Tris-buffered saline)

TEM: Microscopia electrónica de transmisión (Transmission Electron Microscopy)

Th1: Linfocitos T cooperadores tipo 1

Th2: Linfocitos T cooperadores tipo 2

TMB: 3,3',5,5'- Tetrametilbencidina

UV: Luz ultravioleta

VLP: Partículas tipo virus (Virus-like particles)

WHO: Organización Mundial de la Salud (World Health Organization)

wt: Silvestre (wild type)

12. Referencias

1. Pulendran B, Ahmed R. Immunological mechanisms of vaccination. *Nat Immunol.* 2011;12:509–17.
2. Strategic Advisory Group of Experts on Immunization. 2018 Assessment report of the Global Vaccine Action Plan. Geneva: World Health Organization; 2018 (WHO/IVB/18.11). 2018.
https://www.who.int/immunization/global_vaccine_action_plan/en/. Accessed 20 Aug 2012.
3. Stanley Plotkin, Walter Orenstein, Paul Offit KME. Plotkin's Vaccines. 7th ed. Elsevier; 2018. doi:10.1016/C2013-0-18914-3.
4. Jenner E. An inquiry into the causes and effects of the variolae vaccinae: a disease discovered in some of the western counties of England, particularly Gloucestershire, and known by the name of the cow pox. 1802. doi:<http://resource.nlm.nih.gov/2559001R>.
5. Salmon D, Smith T. On a new method of producing immunity from contagious diseases. *Proc Biol Soc Washington.* 1886;3:29–33. <https://www.biodiversitylibrary.org/part/92159>. Accessed 19 Mar 2020.
6. Centers for Disease Control and Prevention. *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases.* 10th edition. Cambridge: Cambridge University Press; 2008. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
7. Sabin AB. Studies on Variants of Poliomyelitis Virus: I. Experimental Segregation and Properties of Avirulent Variants of Three Immunologic Types. *J Exp Med.* 1954;99:551–76. doi:10.1084/jem.99.6.551.
8. Karch CP, Burkhard P. Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies. *Biochem Pharmacol.* 2016;120:1–14. doi:10.1016/j.bcp.2016.05.001.
9. Vichnin M, Bonanni P, Klein NP, Garland SM, Block SL, Kjaer SK, et al. An Overview of Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine Safety: 2006 to 2015. *Pediatr Infect Dis J.* 2015;34:983–91.
10. Vetter V, Denizer G, Friedland LR, Krishnan J, Shapiro M. Understanding modern-day

vaccines: what you need to know. *Ann Med.* 2018;50:110–20.

doi:10.1080/07853890.2017.1407035.

11. P. Wen E, Ellis R, S. Pujar N. *Vaccine Development and Manufacturing.* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2014. doi:10.1002/9781118870914.

12. Delrue I, Verzele D, Madder A, Nauwynck HJ. Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges. *Expert Rev Vaccines.* 2012;11:695–719. doi:10.1586/erv.12.38.

13. Delany I, Rappuoli R, De Gregorio E. Vaccines for the 21st century. *EMBO Mol Med.* 2014;6:708–20. doi:10.1002/emmm.201403876.

14. Francis MJ. Recent Advances in Vaccine Technologies. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 2017;48:231–41.

15. Jimenez-Guardeño JM, Regla-Nava JA, Nieto-Torres JL, DeDiego ML, Castaño-Rodríguez C, Fernandez-Delgado R, et al. Identification of the Mechanisms Causing Reversion to Virulence in an Attenuated SARS-CoV for the Design of a Genetically Stable Vaccine. *PLOS Pathog.* 2015;11:e1005215. doi:10.1371/journal.ppat.1005215.

16. Vartak A, Sucheck SJ. Recent advances in subunit vaccine carriers. *Vaccines.* 2016;4:1–18.

17. Marciani DJ, Kensil CR, Beltz GA, Hung C ho, Cronier J, Aubert A. Genetically-engineered subunit vaccine against feline leukaemia virus: protective immune response in cats. *Vaccine.* 1991;9:89–96.

18. Hu J, Liang Y, Hu Z, Wang X, Gu M, Li R, et al. Recombinant baculovirus vaccine expressing hemagglutinin of H7N9 avian influenza virus confers full protection against lethal highly pathogenic H7N9 virus infection in chickens. *Arch Virol.* 2019;164:807–17. doi:https://doi.org/10.1007/s00705-018-04142-4.

19. Emini EA, Ellis RW, Miller WJ, McAleer WJ, Scolnick EM, Gerety RJ. Production and immunological analysis of recombinant hepatitis B vaccine. *J Infect.* 1986;13 SUPPL. A:3–9.

20. Martelli P, Ferrari L, Morganti M, De Angelis E, Bonilauri P, Guazzetti S, et al. One dose of a porcine circovirus 2 subunit vaccine induces humoral and cell-mediated immunity and protects against porcine circovirus-associated disease under field conditions. *Vet*

- Microbiol. 2011;149:339–51. doi:10.1016/j.vetmic.2010.12.008.
21. Hua RH, Huo H, Li YN, Xue Y, Wang XL, Guo LP, et al. Generation and efficacy evaluation of recombinant classical swine fever virus E2 glycoprotein expressed in stable transgenic mammalian cell line. *PLoS One*. 2014;9:1–9.
 22. Liew PS, Hair-Bejo M. Farming of Plant-Based Veterinary Vaccines and Their Applications for Disease Prevention in Animals. *Adv Virol*. 2015;2015.
 23. Sahdev P, Ochyl LJ, Moon JJ. Biomaterials for Nanoparticle Vaccine Delivery Systems. *Pharm Res*. 2014;31:2563–82. doi:10.1007/s11095-014-1419-y.
 24. Marsian J, Fox H, Bahar MW, Kotecha A, Fry EE, Stuart DI, et al. Plant-made polio type 3 stabilized VLPs-A candidate synthetic polio vaccine. *Nat Commun*. 2017;8. doi:10.1038/s41467-017-00090-w.
 25. Rodríguez-Limas WA, Sekar K, Tyo KEJ. Virus-like particles: The future of microbial factories and cell-free systems as platforms for vaccine development. *Curr Opin Biotechnol*. 2013;24:1089–93.
 26. Mia L. *Subunit Vaccine Delivery*. New York, NY: Springer New York; 2015. doi:10.1007/978-1-4939-1417-3.
 27. Shen Y, Hao T, Ou S, Hu C, Chen L. Applications and perspectives of nanomaterials in novel vaccine development. *Medchemcomm*. 2018;9:226–38.
 28. Haagmans BL, van den Brand JMA, Raj VS, Volz A, Wohlsein P, Smits SL, et al. An orthopoxvirus-based vaccine reduces virus excretion after MERS-CoV infection in dromedary camels. *Science (80-)*. 2016;351:77–81. doi:10.1126/science.aad1283.
 29. Iqbal M. Progress toward the development of polyvalent vaccination strategies against multiple viral infections in chickens using herpesvirus of turkeys as vector. *Bioeng Bugs*. 2012;3:222–6. doi:10.4161/bbug.20476.
 30. CVMP C for MP for VU. Innovax-ND-IBD: Common name: Newcastle disease, infectious bursal disease and Marek's disease vaccine (live recombinant). *Eur Med Agency*. 2017;1 June.
 31. CVMP C for MP for VU. Nobivac Myxo-RHD PLUS Common name : Myxomatosis and rabbit haemorrhagic viral disease vaccine. *Eur Med Agency*. 2019;1 September.
 32. CVMP C for MP for VU. CLYNAV: Salmon pancreas disease vaccine (recombinant

- DNA plasmid). Eur Med Agency. 2016;1 April:1–2.
33. Tiriveedhi V. Vaccines: DNA. eLS. 2018; May:1–8.
34. Hobernik D, Bros M. DNA vaccines—How far from clinical use? *Int J Mol Sci*. 2018;19:1–28.
35. Lee S, Nguyen MT. Recent Advances of Vaccine Adjuvants for Infectious Diseases. *Immune Netw*. 2015;15:51. doi:10.4110/in.2015.15.2.51.
36. Shi S, Zhu H, Xia X, Liang Z, Ma X, Sun B. Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvanticity. *Vaccine*. 2019;37:3167–78. doi:10.1016/j.vaccine.2019.04.055.
37. Leroux-Roels G. Unmet needs in modern vaccinology. Adjuvants to improve the immune response. *Vaccine*. 2010;28 SUPPL. 3.
38. HogenEsch H. Mechanism of immunopotentiality and safety of aluminum adjuvants. *Front Immunol*. 2012;3 JAN:1–13.
39. Del Giudice G, Rappuoli R, Didierlaurent AM. Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines. *Semin Immunol*. 2018; May:0–1. doi:10.1016/j.smim.2018.05.001.
40. Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. *Immunol Cell Biol*. 2004;82:488–96.
41. Serre K, Mohr E, Bénézech C, Bird R, Khan M, Caamaño JH, et al. Selective effects of NF- κ B1 deficiency in CD4+ T cells on Th2 and TFh induction by alum-precipitated protein vaccines. *Eur J Immunol*. 2011;41:1573–82.
42. Noel Masihi K, Lange W, Brehmer W, Ribic E. Immunobiological activities of nontoxic lipid A: Enhancement of nonspecific resistance in combination with trehalose dimycolate against viral infection and adjuvant effects. *Int J Immunopharmacol*. 1986;8:339–45.
43. Harandi AM. Systems analysis of human vaccine adjuvants. *Semin Immunol*. 2018;39 August:30–4. doi:10.1016/j.smim.2018.08.001.
44. Clark TW, Pareek M, Hoschler K, Dillon H, Nicholson KG, Groth N, et al. Trial of 2009 influenza A (H1N1) monovalent MF59-adjuvanted vaccine. *N Engl J Med*. 2009;361:2424–35.
45. Sivakumar SM, Safhi MM, Kannadasan M, Sukumaran N. Vaccine adjuvants - Current

- status and prospects on controlled release adjuvancity. *Saudi Pharm J*. 2011;19:197–206. doi:10.1016/j.jsps.2011.06.003.
46. Scheiermann J, Klinman DM. Clinical evaluation of CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases and cancer. *Vaccine*. 2014;32:6377–89. doi:10.1016/j.vaccine.2014.06.065.
47. Klinman DM. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:249–58.
48. Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, Giannini SL, Bisteau M, Carlsen H, et al. AS04, an Aluminum Salt- and TLR4 Agonist-Based Adjuvant System, Induces a Transient Localized Innate Immune Response Leading to Enhanced Adaptive Immunity. *J Immunol*. 2009;183:6186–97.
49. Laupèze B, Hervé C, Di Pasquale A, Tavares Da Silva F. Adjuvant Systems for vaccines: 13 years of post-licensure experience in diverse populations have progressed the way adjuvanted vaccine safety is investigated and understood. *Vaccine*. 2019;37:5670–80. doi:10.1016/j.vaccine.2019.07.098.
50. Rampling T, Ewer KJ, Bowyer G, Edwards NJ, Wright D, Sridhar S, et al. Safety and efficacy of novel malaria vaccine regimens of RTS,S/AS01B alone, or with concomitant ChAd63-MVA-vectored vaccines expressing ME-TRAP. *npj Vaccines*. 2018;3:1–9. doi:10.1038/s41541-018-0084-2.
51. Dinges W, Girard PM, Podzamczer D, Brockmeyer NH, García F, Harrer T, et al. The F4/AS01B HIV-1 Vaccine Candidate Is Safe and Immunogenic, but Does Not Show Viral Efficacy in Antiretroviral Therapy-Naive, HIV-1-Infected Adults: A Randomized Controlled Trial. *Med (United States)*. 2016;95:1–10.
52. Kis Z, Shattock R, Shah N, Kontoravdi C. Emerging Technologies for Low-Cost, Rapid Vaccine Manufacture. *Biotechnol J*. 2018;1800376:1800376. doi:10.1002/biot.201800376.
53. Gouglas D, Thanh Le T, Henderson K, Kaloudis A, Danielsen T, Hammersland NC, et al. Estimating the cost of vaccine development against epidemic infectious diseases: a cost minimisation study. *Lancet Glob Heal*. 2018;6:e1386–96. doi:10.1016/S2214-109X(18)30346-2.
54. Velavan TP, Meyer CG. The COVID-19 epidemic. *Trop Med Int Heal*. 2020;25:278–

80.

55. Batista-Duharte A, Martínez DT, Carlos IZ. Efficacy and safety of immunological adjuvants. Where is the cut-off? *Biomed Pharmacother.* 2018;105 May:616–24.

56. Crépeaux G, Eidi H, David M-O, Baba-Amer Y, Tzavara E, Giros B, et al. Non-linear dose-response of aluminium hydroxide adjuvant particles: Selective low dose neurotoxicity. *Toxicology.* 2017;375:48–57. doi:10.1016/j.tox.2016.11.018.

57. World Health Organization. Global Vaccine Action Plan 2011-2020. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2013;;1–147. doi:10.1016/j.vaccine.2013.02.015.

58. Pelliccia M, Andreozzi P, Paulose J, D’Alicarnasso M, Cagno V, Donalisio M, et al. Additives for vaccine storage to improve thermal stability of adenoviruses from hours to months. *Nat Commun.* 2016;7:13520. doi:10.1038/ncomms13520.

59. Zou J, Xie X, Luo H, Shan C, Muruato AE, Weaver SC, et al. A single-dose plasmid-launched live-attenuated Zika vaccine induces protective immunity. *EBioMedicine.* 2018;36:92–102. doi:10.1016/j.ebiom.2018.08.056.

60. Akbarzadeh A, Rezaei-sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N. Liposome : classification , preparation , and applications. *Nanoscale Res Lett.* 2013;8:1. doi:10.1186/1556-276X-8-102.

61. Gupta RK, Siber GR. Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects. *Vaccine.* 1995;13:1263–76.

62. Sivakumar SM, Safhi MM, Kannadasan M, Sukumaran N. Vaccine adjuvants - Current status and prospects on controlled release adjuvancity. *Saudi Pharm J.* 2011;19:197–206. doi:10.1016/j.jsps.2011.06.003.

63. Karch CP, Burkhard P. Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies. *Biochem Pharmacol.* 2016;120:1–14. doi:10.1016/j.bcp.2016.05.001.

64. Wang H, Xie H, Wu J, Wei X, Zhou L, Xu X, et al. Structure-Based Rational Design of Prodrugs to Enable Their Combination with Polymeric Nanoparticle Delivery Platforms for Enhanced Antitumor Efficacy. *Angew Chemie - Int Ed.* 2014;53:11532–7.

65. Prego C, Paolicelli P, Díaz B, Vicente S, Sánchez A, González-Fernández Á, et al. Chitosan-based nanoparticles for improving immunization against hepatitis B infection.

Vaccine. 2010;28:2607–14.

66. Zhao L, Seth A, Wibowo N, Zhao CX, Mitter N, Yu C, et al. Nanoparticle vaccines. *Vaccine*. 2014;32:327–37. doi:10.1016/j.vaccine.2013.11.069.

67. Apostólico J de S, Lunardelli VAS, Coirada FC, Boscardin SB, Rosa DS. Adjuvants: Classification, Modus Operandi , and Licensing. *J Immunol Res*. 2016;2016:1–16. doi:10.1155/2016/1459394.

68. Champion CI, Kickhoefer VA, Liu G, Moniz RJ, Freed AS, Bergmann LL, et al. A vault nanoparticle vaccine induces protective mucosal immunity. *PLoS One*. 2009;4.

69. He D, Marles-Wright J. Ferritin family proteins and their use in bionanotechnology. *N Biotechnol*. 2015;32:651–7. doi:10.1016/j.nbt.2014.12.006.

70. Sliepen K, Ozorowski G, Burger JA, Van Montfort T, Stunnenberg M, LaBranche C, et al. Presenting native-like HIV-1 envelope trimers on ferritin nanoparticles improves their immunogenicity. *Retrovirology*. 2015;12:1–5.

71. Yang Y, Ringler P, Müller SA, Burkhard P. Optimizing the refolding conditions of self-assembling polypeptide nanoparticles that serve as repetitive antigen display systems. *J Struct Biol*. 2012;177:168–76. doi:10.1016/j.jsb.2011.11.011.

72. McCoy ME, Golden HE, Doll TA, Yang Y, Kaba SA, Burkhard P, et al. Mechanisms of protective immune responses induced by the Plasmodium falciparum circumsporozoite protein-based, self-assembling protein nanoparticle vaccine. *Malar J*. 2013;12:136. doi:10.1186/1475-2875-12-136.

73. Sampieri A, Luz-Madrigal A, Zepeda J, Vaca L. Identification of fragments from Autographa Californica polyhedrin protein essential for self-aggregation and exogenous protein incorporation. *BMC Biochem*. 2015;16:1–12. doi:10.1186/s12858-015-0034-9.

74. Zepeda-Cervantes J, Cruz-Reséndiz A, Sampieri A, Carreón-Nápoles R, Sánchez-Betancourt JI, Vaca L. Incorporation of ORF2 from Porcine Circovirus Type 2(PCV2) into genetically encoded nanoparticles as a novel vaccine using a self-aggregating peptide. *Vaccine*. 2019;37:1928–37. doi:10.1016/j.vaccine.2019.02.044.

75. Rohrmann GF. Polyhedrin Structure. *J Gen Virol*. 1986;67:1499–513. doi:10.1099/0022-1317-67-8-1499.

76. López MG, Diez M, Alfonso V, Taboga O. Biotechnological applications of occlusion

- bodies of Baculoviruses. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018;102:1–10. doi:10.1007/s00253-018-9130-2.
77. Slack J, Arif BM. The Baculoviruses Occlusion-Derived Virus: Virion Structure and Function. In: *Advances in Virus Research*. 2006. p. 99–165. doi:10.1016/S0065-3527(06)69003-9.
78. Haase S, Sciocco-Cap A, Romanowski V. Baculovirus insecticides in Latin America: Historical overview, current status and future perspectives. *Viruses*. 2015;7:2230–67.
79. Bergold GH. *Viruses*. ACADEMIC PRESS, INC.; 1827. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-395602-6.50017-2>.
80. Ramoska WA, Stairs GR, Hink WF. Ultraviolet light activation of insect nuclear polyhedrosis virus. *Nature*. 1975;253:628–9. doi:10.1177/1059840512440176.
81. Miller LK. *The Baculoviruses*. Boston, MA: Springer US; 1997. doi:10.1007/978-1-4899-1834-5.
82. Carstens EB, Krebs A, Gallerneault CE. Identification of an amino acid essential to the normal assembly of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedra. *J Virol*. 1986;58:684–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3528527>.
83. Coulibaly F, Chiu E, Gutmann S, Rajendran C, Haebel PW, Ikeda K, et al. The atomic structure of baculovirus polyhedra reveals the independent emergence of infectious crystals in DNA and RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106:22205–10. doi:10.1073/pnas.0910686106.
84. Ji X, Sutton G, Evans G, Axford D, Owen R, Stuart DI. How baculovirus polyhedra fit square pegs into round holes to robustly package viruses. *EMBO J*. 2010;29:505–14. doi:10.1038/emboj.2009.352.
85. Fraser MJ. Patent: Recombinant baculovirus occlusion bodies in vaccines and biological insecticides. 1988.
86. Jarvis DL, Bohlmeier DA, Garcia A. Requirements for nuclear localization and supramolecular assembly of a baculovirus polyhedrin protein. *Virology*. 1991;185:795–810.
87. Je YH, Jin BR, Park HW, Roh JY, Chang JH, Seo SJ, et al. Baculovirus expression vectors that incorporate the foreign protein into viral occlusion bodies. *Biotechniques*.

- 2003;34:81–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12545544>.
88. McLinden JH, Ploplis VA, Fraser MJ. Expression of foreign epitopes on recombinant occlusion bodies of baculoviruses. *Vaccine*. 1992;10:231–7.
89. Lee KS, Sohn MR, Kim BY, Choo YM, Woo SD, Yoo SS, et al. Production of classical swine fever virus envelope glycoprotein E2 as recombinant polyhedra in baculovirus-infected silkworm larvae. *Mol Biotechnol*. 2012;50:211–20.
90. Kim BY, Lee KS, Sohn MR, Woo SD, Yoo SS, Je YH, et al. Production of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus envelope glycoproteins gB and gC as recombinant polyhedra in baculovirus-infected silkworm larvae. *J Asia Pac Entomol*. 2012;15:114–20. doi:10.1016/j.aspen.2011.10.001.
91. Zepeda-Cervantes J, Vaca L. Induction of adaptive immune response by self-aggregating peptides. *Expert Rev Vaccines*. 2018;0:14760584.2018.1507742. doi:10.1080/14760584.2018.1507742.
92. Versura P, Bavelloni A, Blalock W, Fresina M, Campos EC. A rapid standardized quantitative microfluidic system approach for evaluating human tear proteins. *Mol Vis*. 2012;18 October:2526–37.
93. Wright M. Nanoparticle Tracking Analysis for the Multiparameter Characterization and Counting of Nanoparticle Suspensions. In: *Nanoparticles in Biology and Medicine*. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. p. 511–24. doi:10.1007/978-1-61779-953-2_41.
94. Gross J, Sayle S, Karow AR, Bakowsky U, Garidel P. Nanoparticle tracking analysis of particle size and concentration detection in suspensions of polymer and protein samples: Influence of experimental and data evaluation parameters. *Eur J Pharm Biopharm*. 2016;104:30–41. doi:10.1016/j.ejpb.2016.04.013.
95. Nimmerjahn F, Bruhns P, Horiuchi K, Ravetch J V. FcγRIV: A novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity*. 2005;23:41–51.
96. Collins AM. IgG subclass co-expression brings harmony to the quartet model of murine IgG function. *Immunol Cell Biol*. 2016;94:949–54. doi:10.1038/icb.2016.65.
97. NoeDominguez-Romero A, Zamora-Alvarado R, Servín-Blanco R, Pérez-Hernández EG, Castrillon-Rivera LE, Munguia ME, et al. Variable epitope library carrying heavily mutated survivin-derived CTL epitope variants as a new class of efficient vaccine

- immunogen tested in a mouse model of breast cancer. *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10:3201–13. doi:10.4161/hv.29679.
98. Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Hernández M, et al. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect Immun.* 1999;67:2522–30. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/hv.29679>.
99. Frey A, Di Canzio J, Zurakowski D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *J Immunol Methods.* 1998;221:35–41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9894896>.
100. Povarova N, Petri N, Blokhina A, Bogdanov A, Gurskaya N, Lukyanov K. Functioning of Fluorescent Proteins in Aggregates in Anthozoa Species and in Recombinant Artificial Models. *Int J Mol Sci.* 2017;18:1503. doi:10.3390/ijms18071503.
101. Zepeda-Cervantes J. Tesis de Maestría: Evaluación de cristales de poliedrina como vehículo para la expresión de antígenos recombinantes en un modelo murino. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO; 2015.
102. Pichichero ME. Booster vaccinations: Can immunologic memory outpace disease pathogenesis? *Pediatrics.* 2009;124:1633–41.
103. Van Meeren O Der, Bleckmann G, Crasta PD. Immune memory to hepatitis B persists in children aged 7-8 years, who were vaccinated in infancy with 4 doses of hexavalent DTPa-HBV-IPV/Hib (Infanrix™ hexa) vaccine. *Hum Vaccines Immunother.* 2014;10:1682–7.
104. Damasceno PF, Engel M, Glotzer SC. Predictive Self-Assembly of Polyhedra into Complex Structures. *Science (80-).* 2012;337:453–7. doi:10.1126/science.1220869.
105. Mannhalter JW, Neychev HO, Zlabinger GJ, Ahmad R, Eibl MM. Modulation of the human immune response by the non-toxic and non-pyrogenic adjuvant aluminium hydroxide: effect on antigen uptake and antigen presentation. *Clin Exp Immunol.* 1985;61:143–51. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1577243&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
106. Matheis W, Zott A, Schwanig M. The role of the adsorption process for production

and control combined adsorbed vaccines. *Vaccine*. 2001;20:67–73.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11567747>.

107. Marrack P, McKee AS, Munks MW. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:287–93. doi:10.1038/nri2510.

108. Janeway CA, Paul Travers J, Walport M, J. SM. *Immunobiology*. 5th edition. 2001.

109. Rimaniol AC, Gras G, Verdier F, Capel F, Grigoriev VB, Porcheray F, et al.

Aluminum hydroxide adjuvant induces macrophage differentiation towards a specialized antigen-presenting cell type. *Vaccine*. 2004;22:3127–35.

110. Palm AKE, Henry C. Remembrance of Things Past: Long-Term B Cell Memory After Infection and Vaccination. *Front Immunol*. 2019;10 July:1787.

111. Sarkander J, Hojyo S, Tokoyoda K. Vaccination to gain humoral immune memory. 2016; July:1–6.

112. Sell S. How vaccines work: immune effector mechanisms and designer vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2019;18:993–1015. doi:10.1080/14760584.2019.1674144.

113. Bretscher PA, Wei G, Menon JN, Bielefeldt-Ohmann H. Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes “susceptible” mice resistant to *Leishmania major*. *Science*. 1992;257:539–42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1636090>.

114. Germann T, Bongartz M, Dlugonska H, Hess H, Schmitt E, Kolbe L, et al. Interleukin-12 profoundly up-regulates the synthesis of antigen-specific complement-fixing IgG2a, IgG2b and IgG3 antibody subclasses in vivo. *Eur J Immunol*. 1995;25:823–9.

115. Skibinski DAG, Jones LA, Zhu YO, Xue LW, Au B, Lee B, et al. Induction of Human T-cell and Cytokine Responses Following Vaccination with a Novel Influenza Vaccine. *Sci Rep*. 2018;8:1–12.

116. Spellberg B, Edwards JE. Type 1/Type 2 Immunity in Infectious Diseases. *Clin Infect Dis*. 2002;32:76–102.

117. Chang JCC, Diveley JP, Savary JR, Jensen FC. Adjuvant activity of incomplete Freund’s adjuvant. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998;32:173–86. doi:10.1016/S0169-409X(98)00009-X.

118. Wolfson LJ, Gasse F, Lee-martin S, Lydon P, Magan A, Tibouti A, et al. Estimating the costs of achieving the WHO – UNICEF Global Immunization Vision and Strategy ,

2006 – 2015. 2015;045096 June 2007:2006–15.

119. Chang TZ, Deng L, Wang B, Champion JA. H7 Hemagglutinin nanoparticles retain immunogenicity after >3 months of 25°C storage. *PLoS One*. 2018;13:e0202300.

doi:10.1371/journal.pone.0202300.

120. Hu Y, Hoerle R, Ehrich M, Zhang C. Engineering the lipid layer of lipid-PLGA hybrid nanoparticles for enhanced in vitro cellular uptake and improved stability. *Acta Biomater*. 2015;28:149–59. doi:10.1016/j.actbio.2015.09.032.

121. Mistilis MJ, Joyce JC, Esser ES, Skountzou I, Compans RW, Bommarius AS, et al. Long-term stability of influenza vaccine in a dissolving microneedle patch. *Drug Deliv Transl Res*. 2017;7:195–205. doi:10.1007/s13346-016-0282-2.

122. Yue H, Wei W, Yue Z, Lv P, Wang L, Ma G, et al. Particle size affects the cellular response in macrophages. *Eur J Pharm Sci*. 2010;41:650–7. doi:10.1016/j.ejps.2010.09.006.

123. Joshi VB, Geary SM, Salem AK. Biodegradable Particles as Vaccine Delivery Systems: Size Matters. *AAPS J*. 2013;15:85–94. doi:10.1208/s12248-012-9418-6.

124. Thomas C, Gupta V, Ahsan F. Particle Size Influences the Immune Response Produced by Hepatitis B Vaccine Formulated in Inhalable Particles. *Pharm Res*. 2010;27:905–19. doi:10.1007/s11095-010-0094-x.

125. Kanchan V, Panda AK. Interactions of antigen-loaded polylactide particles with macrophages and their correlation with the immune response. *Biomaterials*. 2007;28:5344–57.

126. Yang L, Li W, Kirberger M, Liao W, Ren J. Design of nanomaterial based systems for novel vaccine development. *Biomater Sci*. 2016;4:785–802.

13. Anexos

13.1 Artículos publicados

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31959159/>

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30824359/>