



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

“Caracterización y evaluación del efecto inmunogénico de las vacunas multiepitópicas MultiHIV-A y MultiHIV-B acopladas a la VLP VP2 del parvovirus humano B19”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:
ALAIL ANTONIO RUÍZ CRUZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

Dra. LETICIA MORENO FIERROS

Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

CÓMITE TUTOR:

Dra. PERLA MARIANA DEL RÍO ESTRADA

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, INER.

Dr. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN

Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

CD. MX. Enero, 2019



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.



OFICIO CPCB/1092/2018

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.


M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 3 de septiembre de 2018, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **RUIZ CRUZ ALAIL ANTONIO**, con número de cuenta **411035680**, con la tesis titulada "**Caracterización y evaluación del efecto inmunogénico de las vacunas multiepitópicas MultiHIV-A y MultiHIV-B acopladas a la VLP VP2 del parvovirus humano B19**", realizada bajo la dirección de la **DRA. LETICIA MORENO FIERROS**:

Presidente: DR. JUAN XICOHTENCATL CORTÉS
Vocal: DR. ISMAEL BUSTOS JAIMES
Secretario: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN
Suplente: DR. JUAN PABLO REYES GRAJEDA
Suplente: DR. JOSÉ BUSTOS ARRIAGA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 16 de noviembre de 2018.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por permitirme realizar mis estudios de Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por aceptarme dentro del programa de becas nacionales con el número de CVU 779838. Esto fue determinante para concluir en forma mis estudios de posgrado.

Este proyecto se realizó gracias a los siguientes apoyos:

CONACyT CB283319

PAPIT IN2233319

PAPIT IN219416

PAPCA 2016-28

Agradezco a la Dra. Leticia Moreno Fierros por dirigir mi trabajo de maestría, algo determinante en para mi desarrollo académico y profesional. Además a la Dra. Perla Mariana del Río Estrada y al Dr. Luis Arturo Baiza Gutman, miembros de mi comité tutor, gracias por sus consejos y apoyo durante la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Agradezco a nuestra máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México y a su programa de Posgrado en Ciencias Biológicas por permitirme realizar mis estudios de Maestría.

A la Dra. Perla Mariana del Río Estrada y al Dr. Luis Arturo Baiza Gutman, miembros de mi comité tutor, gracias por sus consejos y apoyo durante la realización de este trabajo.

A los Doctores Juan Xicohtencatl Cortés, Ismael Bustos Jaimes, Luis Arturo Baiza Gutman, Juan Pablo Reyes Grajeda y José Bustos Arriaga, miembros de mi jurado, por sus estupendos comentarios y por sus críticas, en todo momento constructivas, gracias.

Al Dr. Ismael Bustos Jaimes por su apoyo y amabilidad durante la realización de mi trabajo.

A la M. en C. Damaris Ilhuicatzí Alvarado por su apoyo técnico para la realización de este trabajo.

Y finalmente agradezco a la Dra. Leticia Moreno Fierros por dirigir mi trabajo de maestría, algo determinante en para mi desarrollo académico y profesional. Sin duda es usted un ejemplo a seguir no solo como profesionista, sino también como persona.

DEDICATORIA

A Patricia, Fernando y abuelos, soy afortunado de que el destino los haya puesto en mi camino, gracias por estar siempre conmigo, los quiero.

Itzel, mi mejor amiga, no puedo no mencionar el gran cariño y admiración que siento hacia ti, gracias por tantos y tantos buenos momentos.

Fernando, Jhon y Carlos por todas esas risas y anécdotas, sin duda los amigos más serviciales.

Mis amigos Itzel, Damaris, Karlita, Dany, Marilú, Liz, Kath, Néstor, Robert, Jorge, Ángel, Ernesto, Mauricio y por supuesto a mi amigo David, uno no entiende ese concepto de "segunda familia" hasta que se cruza con tan buenas personas como ustedes, es un placer hacer ciencia a su lado.

Por último, a ellas, porque sin temor a equivocarme, puedo asegurar que los más grandes ejemplos, esos que han forjado mis fundamentos como persona, los he aprendido de una mujer. Por ello, espero que algún día dejemos de ver como algo cotidiano esta terrible realidad en la que hoy en día estamos sumergidos: la violencia. Esta aterradora violencia que día con día nos llena de horror y que lamentablemente ha arreciado en mayor medida contra las mujeres, de todo corazón, espero que algún día, en nuestro México, la sociedad experimente, como los anticuerpos, un cambio de switch y que las personas nos volvamos más conscientes, sensibles y sobre todo más humanas. Como hombre, creo debemos empezar a ejercer más que nadie los "valores", comenzando por el respeto, la equidad e igualdad hacia ellas, para algún día disminuir o en el mejor de los casos exterminar esta espantosa situación, ya que ¿qué sería de la vida de un hombre, sin una mujer a lado?

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
Síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida (SIDA)	5
Virus de Inmunodeficiencia Humana y ciclo de vida del HIV	7
Etapas clínicas de la infección por HIV	9
Tratamientos contra el VIH	9
Vacunas y anticuerpos ampliamente neutralizantes	10
ANTECEDENTES	12
Vacunas multiepitópicas	12
Las VLPs como sistemas de entrega de antígeno y la proteína VP2 del Parvovirus humano B19	14
OBJETIVOS	16
METODOLOGÍA	17
Diseño y síntesis de las construcciones VP2 _{MultiHIV-A} y VP2 _{MultiHIV-B}	17
Clonación de las construcciones quiméricas VP2 _{MultiHIV-A} y VP2 _{MultiHIV-B} dentro del vector de expresión pET22b(+)	17
Expresión de las construcciones quiméricas VP2 _{MultiHIV-A} y VP2 _{MultiHIV-B}	19
Purificación de VP2 _{MultiHIV-A} y VP2 _{MultiHIV-B}	20
“Western blot” de las quimeras VP2 _{MultiHIV-A} y VP2 _{MultiHIV-B}	21
Evaluación del ensamblaje de las quimeras VP2 _{MultiHIV-A} y VP2 _{MultiHIV-B} por dispersión dinámica de luz (DLS)	21
Inmunización de ratones de la cepa C57BL/6 con VP2 _{MultiHIV-A} y VP2 _{MultiHIV-B}	22
Proliferación celular	23
Respuesta de anticuerpos	24
Análisis estadístico	25
RESULTADOS	25
Diseño de los péptidos multiepitópicos de HIV y su acoplamiento a la VP2	25
Diseño de oligonucleótidos y clonación de las quimeras de VP2 VP2 _{MultiHIV-A} y VP2 _{MultiHIV-B}	29
Secuenciación de las construcciones VP2 _{MultiHIV-A} y VP2 _{MultiHIV-B}	32
Expresión de las quimeras de VP2 VP2 _{MultiHIV-A} y VP2 _{MultiHIV-B}	33
“Western blot” hacia las quimeras VP2 _{MultiHIV-A} y VP2 _{MultiHIV-B}	35
Ensamblaje y dispersión dinámica de luz de las VLPs de VP2 _{MultiHIV-A} y VP2 _{MultiHIV-B}	36
Evaluación de las respuestas celulares tras la inmunización de las VLPs de VP2 _{MultiHIV-A} y VP2 _{MultiHIV-B}	39
Evaluación de las respuestas humorales tras la inmunización de las VLPs de VP2 _{MultiHIV-A} y VP2 _{MultiHIV-B}	42
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	53
LITERATURA CITADA	54
FIGURAS SUPLEMENTARIAS	59

RESUMEN

El Virus de inmunodeficiencia humana (VIH) es un lentivirus miembro de la familia de Retroviridae y agente causal del síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida (SIDA) continúa siendo hasta hoy en día un grave problema de salud a nivel mundial. Por esto es necesario buscar terapias profilácticas que sean capaces de estimular altos niveles de inmunidad protectora cuando se da el contacto entre el virus y el huésped. Se han probado diversos enfoques para desarrollar vacunas hacia el VIH, sin embargo la alta tasa mutacional del virus representa uno de los principales obstáculos a vencer para lograr obtener una vacuna eficaz con amplia cobertura. El enfoque basado en la selección de epítomos conservados del VIH, que sean capaces de generar anticuerpos con amplia capacidad de neutralizar diversos aislados del HIV, es una alternativa prometedora para el desarrollo de vacunas. Al respecto, el enfoque de vacunas multiepitópicas representa un sistema ventajoso porque permite ampliar la cobertura e incluso puede incrementar la capacidad de neutralizar aislados primarios del HIV al dirigir la respuesta inmune a regiones proteicas importantes o conservadas del virus, tal como la gp120 y la gp41. La baja inmunogenicidad es una de las limitaciones en el uso de péptidos vacunales multiepitópicos. Sin embargo, esto puede superarse usando sistemas de entrega adecuados. Las partículas tipo virus (VLP) representan un atractivo sistema de suministro de antígeno debido a su capacidad para estimular respuestas tanto humorales como celulares. En específico las VLPs del parvovirus humano B19 (B19V), ofrecen ventajas sobre otras VLPs. Una de ellas es que se ha utilizado como sistema de entrega de antígeno para el desarrollo de vacunas. Pueden formarse VLPs conformadas solamente de la proteína VP2, la VP2 puede expresarse en *E. coli*, purificarse en forma desnaturalizada y una vez re naturalizada tiene la capacidad de auto ensamblarse *in vitro* asemejando a la cápside silvestre. Además, por su naturaleza estructural, la VP2 permite anclar secuencias en el extremo amino terminal sin perder la capacidad de auto ensamblarse y las secuencias agregadas a las VP2 se despliegan hacia la superficie de la envoltura.

Por lo antes mencionado, el objetivo de este trabajo fue diseñar, producir y evaluar el potencial inmunogénico de dos construcciones de VP2 quiméricas multiepitópicas contra VIH, desplegadas en VLPs del B19V. La metodología fue: en primera instancia la selección de epítomos reconocidos por anticuerpos ampliamente neutralizantes contra el VIH, posteriormente se diseñaron dos proteínas que los contuvieran bajo un enfoque multiepitópico, y se acoplaron a la VP2 del B19V. Estas quimeras fueron nombradas VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B}. Una vez sintetizadas ambas construcciones, se clonaron, expresaron y purificaron. Posteriormente se probó la capacidad de ambas proteínas para formar VLPs, y finalmente se evaluaron las respuestas humorales y celulares generadas por ratones de la cepa C57BL/6 que fueron inmunizados por vía intranasal con ambas quimeras de VP2. De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó que ambas regiones multiepitópicas acopladas a la VP2 del B19V fueron capaces de formar VLPs completas. Los ratones de la cepa C57BL/6 que fueron inmunizados con las VLPs de la quimera VP2_{MultiHIV-A} no indujeron respuestas ni a nivel celular ni humoral, mientras que las VLPs de la quimera VP2_{MultiHIV-B} indujeron proliferación de linfocitos CD4+ y CD8+ provenientes del bazo de ratones inmunizados con esta quimera, además de generar respuestas de anticuerpos de los isotipos IgG1 a nivel sistémico y de IgA en mucosa vaginal en ratones tratados con estas VLPs. Se concluyó que ambas quimeras, VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B}, que contienen múltiples epítomos contra el VIH acoplados a la VP2 del B19V fueron capaces de formar VLPs completas. Al evaluar las respuestas inmunológicas generadas por ratones inmunizados estas VLPs, se encontró que las VLPs de la quimera VP2_{MultiHIV-B} sí mostraron ser inmunogénicas al inducir respuestas significativas a nivel celular y humoral en los ratones inmunizados con estas VLPs. Aunque la quimera VP2_{MultiHIV-A}, no mostró ser inmunogénica, es necesario evaluar otras dosis o modificar el diseño de la construcción. Los resultados indican que las VLP's de VP2 quiméricas son un buen sistema para diseñar vacunas multiepitópicas hacia HIV aunque se requieren estudios futuros evaluar la capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes.

ABSTRACT

The Human Immunodeficiency Virus (HIV) is a lentivirus member of the Retroviridae family and the causative agent of acquired human immunodeficiency syndrome (AIDS) continues to be a serious health problem worldwide. This is why it is necessary to look for prophylactic therapies that are capable of stimulating high levels of protective immunity when there is contact between the virus and the host. Several approaches have been tried to develop vaccines towards HIV, however the high mutational rate of the virus represents one of the main obstacles to overcome in order to obtain an effective vaccine with broad coverage. The approach based on the selection of conserved epitopes of HIV, which are capable of generating antibodies with ample capacity to neutralize various isolates of HIV, is a promising alternative for the development of vaccines. In this regard, the approach of multiepitopic vaccines represents an advantageous system because it allows to expand the coverage and can even increase the capacity to neutralize primary isolates of HIV by directing the immune response to important or conserved protein regions of the virus, such as gp120 and gp41. Low immunogenicity is one of the limitations in the use of multiepitopic vaccine peptides. However, this can be overcome by using appropriate delivery systems. Virus-like particles (VLP's) represent an attractive antigen delivery system due to their ability to stimulate both humoral and cellular responses. Specifically, the VLP's of the human parvovirus B19 (B19V) offer advantages over other VLPs. One of them is that it has been used as an antigen delivery system for the development of vaccines. VLP's formed only of the VP2 protein can be formed, VP2 can be expressed in *E. coli*, purified in denatured form and once re naturalized it has the ability to self-assemble in vitro similar to the native capsid. In addition, due to its structural nature, VP2 allows anchoring sequences at the amino terminus without losing the ability to self-assemble and the sequences added to VP2 unfold towards the surface of the envelope.

For the aforementioned, the objective of this work was to design, produce and evaluate the immunogenic potential of two chimeric constructs of multimeric

VP2 against HIV, deployed in VLPs of the B19V. The methodology was: in the first instance the selection of epitopes recognized by broadly neutralizing antibodies against HIV, then two proteins were designed to contain them under a multiepitopic approach, and they were coupled to the VP2 of B19V. These chimeras were named VP2_{MultiHIV-A} and VP2_{MultiHIV-B}. Once both constructs were synthesized, they were cloned, expressed and purified. Subsequently, the ability of both proteins to form capsids was tested, and finally the humoral and cellular responses generated by mice of strain C57BL/6 that were immunized intranasally with both VP2 chimeras were evaluated. According to the results obtained, it was observed that both multiepitopic regions coupled to VP2 of B19V were able to form complete capsids. The mice of the C57BL / 6 strain that were immunized with the capsids of the VP2_{MultiHIV-A} chimera did not induce cellular or humoral responses, whereas the capsids of the VP2_{MultiHIV-B} chimera induced proliferation of CD4 + and CD8 + lymphocytes from the spleen of mice immunized with this chimera, besides generating antibody responses of the IgG1 isotypes at a systemic level and of IgA in vaginal mucosa in mice treated with these capsids. It was concluded that both chimeras, VP2_{MultiHIV-A} and VP2_{MultiHIV-B}, which contain multiple epitopes against HIV coupled to VP2 of B19V were able to form complete capsids. When evaluating the immunological responses generated by immunized mice these capsids, it was found that the capsids of the VP2_{MultiHIV-B} chimera did show to be immunogenic by inducing significant cellular and humoral responses in the mice immunized with these capsids. Although the VP2_{MultiHIV-A} chimera did not show to be immunogenic, it is necessary to evaluate other doses or modify the design of the construction. The results indicate that chimeric VP2 VLP's are a good system for designing multiepitopic vaccines towards HIV, although future studies evaluating the ability to induce neutralizing antibodies are required.

INTRODUCCIÓN

Síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida (SIDA)

1981 fue un el año en el que se reportaron los primeros casos de quizá la enfermedad más relevante de la última parte del siglo XX. Durante ese año, se observó que en la comunidad homosexual había un incremento en la aparición de raras enfermedades oportunistas y enfermedades malignas que llevaban al rápido deceso de estas personas, lo que a partir de este momento fue denominado como Síndrome de Inmunodeficiencia Humana Adquirida (SIDA o AIDS por sus siglas en inglés)(Barre-Sinoussi et al., 1983; Chermann et al., 1983; Popovic, Sarngadharan, Read, & Gallo, 1984). Debido a la agresividad que mostraba esta enfermedad y a lo rápido que se estaba extendiendo alrededor del mundo, en el año 1982 fue declarada como epidemia. Sin embargo fue hasta el año 1983 cuando se descubrió que el agente causal era un virus, el cual fue nombrado Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). Este infectaba a células del sistema inmunológico, lo que llevaba al estado de inmunodeficiencia y que culminaba en la aparición de estas infecciones y tumores malignos (Barre-Sinoussi et al., 1983; Chermann et al., 1983; Popovic et al., 1984).

Desde el momento en que fue declarada como epidemia, 76.1 millones de personas se han infectado de VIH a nivel mundial y de estos, se sabe que hoy en día 36.7 millones son portadoras del virus. Actualmente la agencia internacional encargada de recabar información acerca de la epidemia de VIH (El Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA, ONUSIDA), en su último informe (2017) reportó que durante la última década ha habido una disminución tanto de la incidencia como de la mortalidad a nivel mundial (figura 1). En México, durante este periodo, se observa un aumento en la incidencia y una ligera disminución en la mortalidad (figura 2). Algo muy importante para tener en cuenta es que, aunque a nivel mundial se observa una disminución tanto en la incidencia como en la mortalidad, también se observa un aumento en la prevalencia de la enfermedad en la población, esto principalmente atribuido a los tratamientos se utilizan actualmente para controlar la infección por VIH (ONUSIDA, 2017).

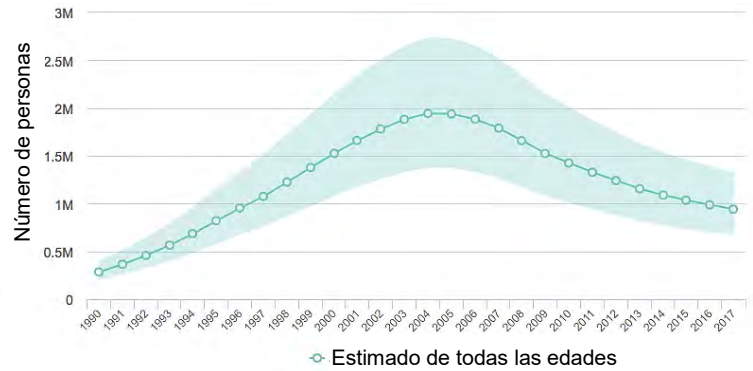
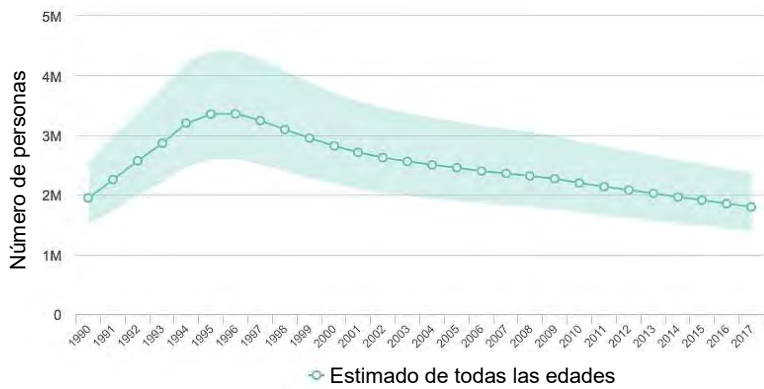


Figura 1. Incidencia y mortalidad del VIH en el mundo. A) Incidencia del VIH a nivel mundial de 1990-2017, B) Muertes relacionadas con VIH a nivel mundial de 1990-2017. Figuras tomadas y modificadas de la base de datos ONUSIDA, 2017.

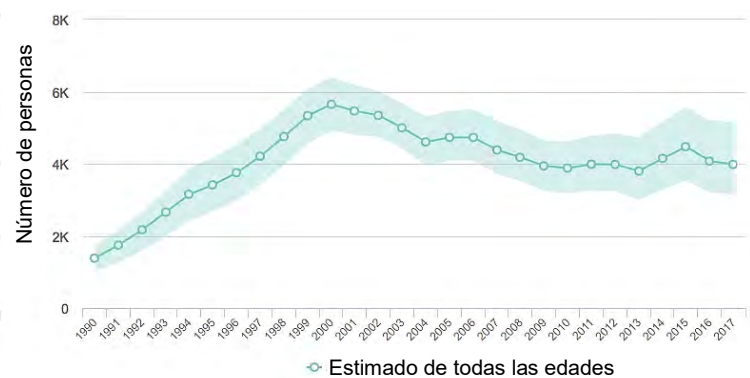
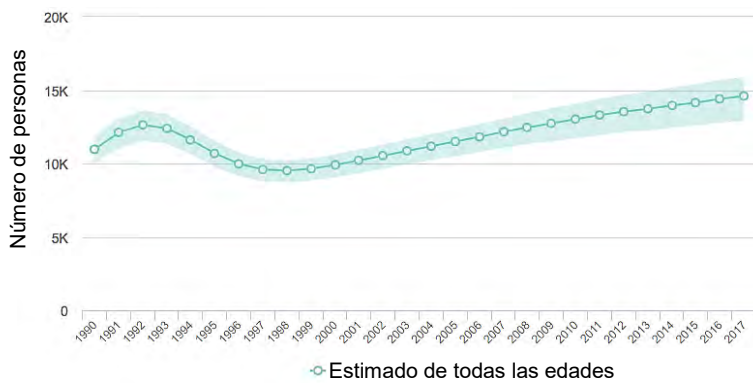


Figura 2. Incidencia y mortalidad del VIH en México. A) Incidencia del VIH en México de 1990-2017, B) Muertes relacionadas con VIH en México de 1990-2017. Figuras tomadas y modificadas de la base de datos ONUSIDA 2017.

Virus de Inmunodeficiencia Humana y ciclo de vida del HIV

El VIH es un virus que pertenece a la familia *Retroviridae* y actualmente se clasifica en dos especies distintas de acuerdo a su distribución geográfica, nombradas HIV-1 y HIV-2. La especie HIV-1 representa más del 90% de las infecciones en todo el mundo, mientras que el HIV-2 es exclusivo de la región Subsahariana de África (Kerina, Babill, & Muller, 2013; Reeves & Doms, 2002). Estas dos variantes de virus difieren tanto en su origen evolutivo como en el porcentaje de homología de su material genético (Coombs, 2010); sin embargo, la variante VIH-1 es más contagiosa y de progresión rápida en personas infectadas en comparación con la variante VIH-2. Además, la cepa HIV-1 ha mostrado ser sumamente heterogénea por lo que se ha clasificado en cuatro grupos, que son M, N, O y P, estos tres últimos son poco comunes dentro de la población y su presencia se reporta en zonas aisladas del mundo, mientras que las cepas pertenecientes al grupo M (o principal) son las causantes de la mayoría de las infecciones reportadas a nivel mundial (Taylor, Sobieszczyk, McCutchan, & Hammer, 2008).

En cuanto a la estructura del VIH, este es un virus de tipo envuelto que contiene dos copias idénticas de RNA de cadena simple, cada copia del material genético codifica para 9 genes (figura 3), que a su vez expresan diversas proteínas que llevan a cabo cuatro funciones principales: la primera, proteínas estructurales de la cápside viral como p15, p18 y p24; la segunda, proteínas que promueven la infectividad viral como Vif (factor de infectividad viral), Vpr (Proteína viral R), Tat (transactivador de la transcripción), Rev (Regulador de la expresión de la proteína viral), Vpu (proteína viral U) y Nef (Proteína reguladora negativa); la tercera, enzimas virales como la Proteasa, Integrasa y la Transcriptasa inversa; cuarta y última, proteínas de la envoltura, que son gp41 y gp120 (figura 4) (German Advisory Committee Blood, 2016). En cuanto a las proteínas de la envoltura, la gp120 es de gran importancia, ya que el contacto de esta con el receptor primario CD4, expresado en la superficie de los linfocitos T, macrófagos y células dendríticas, marca el inicio de la infección, posteriormente se requiere un segundo contacto, donde participa la proteína gp41 de la envoltura viral, esta se une a un correceptor que comúnmente son

receptores de quimiocinas, ya sea CXCR4 o CCR5. Una vez dado este segundo contacto, el VIH inicia la infección de la célula huésped, cuya finalidad es generar nuevas copias virales que ayuden a propagar la infección (Campbell & Hope, 2015; Deeks, Overbaugh, Phillips, & Buchbinder, 2015; Freed, 2015).

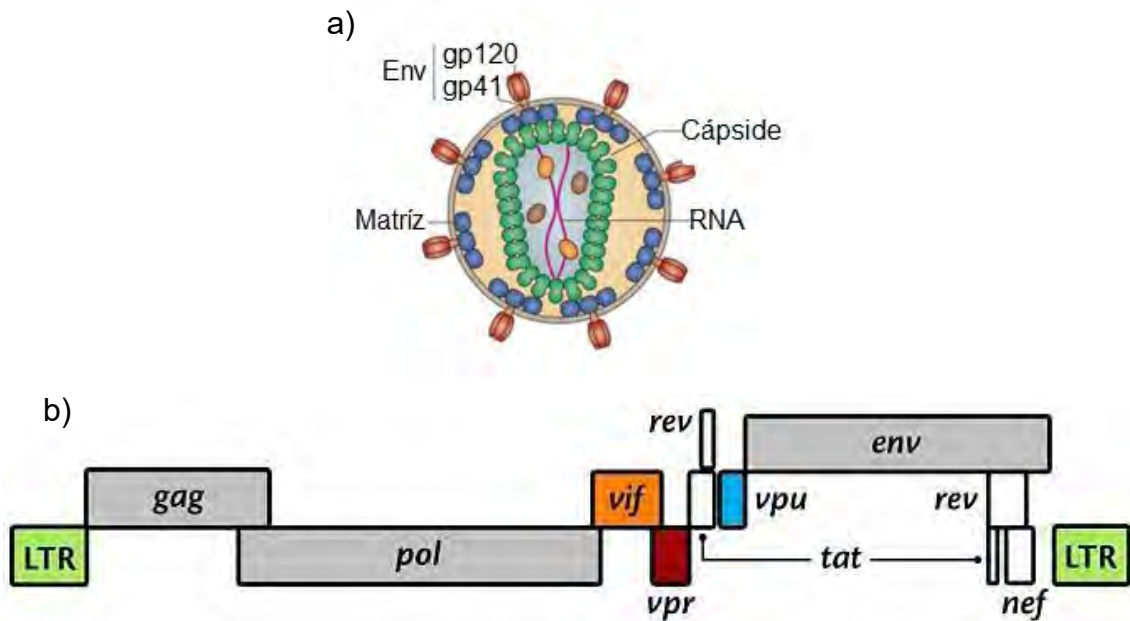


Figura 3. Estructura del VIH y genoma. a) Estructura del VIH, se muestran la envoltura (Env), cápside, retrotranscriptasa y dos copias de RNA viral (Freed, 2015) y b) Genoma del VIH (figura tomada y modificada de www.projectinform.org)

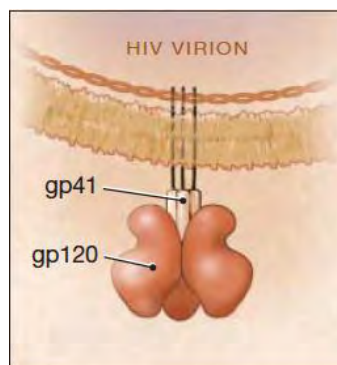


Figura 4. Diagrama de la gp120 y gp41. Tomado y modificado de (Lederman, Penn-Nicholson, Cho, & Mosier, 2006)

Etapas clínicas de la infección por HIV

Una vez que se generan nuevas copias virales, el virus se disemina e inicia la infección, la cual transcurre en tres etapas clínicamente definidas. La primera es la etapa aguda, durante esta etapa las personas experimentan síntomas parecidos a los de la gripe, como fiebre y dolor de cabeza, y a nivel inmunológico se da una disminución de en el conteo de los linfocitos CD4+, mientras que las copias virales se incrementan, esta etapa puede durar de 3-5 semanas. Posterior a esta etapa se da la etapa crónica, al inicio de esta etapa se da una “recuperación” parcial en el conteo de las células CD4+ y el sistema inmune es capaz de controlar la replicación viral, por lo cual esta primera fase de la etapa crónica que es asintomática puede durar de 10 a 15 años, durante este lapso de tiempo las células CD4+ experimentan una depleción progresiva, y por el contrario, las copias virales aumentan (Deeks et al., 2015; Maartens, Celum, & Lewin, 2014). Una que vez dadas estas condiciones, con el sistema inmune “indefenso”, da inicio la segunda etapa de la fase crónica, la cual es sintomática y se caracteriza por la aparición de enfermedades oportunistas, tal es el caso de infecciones causadas por *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis carinii*, CMV, toxoplasmosis y candidiasis, así como por la aparición de tumores, siendo el más común el Sarcoma de Kaposi. Posterior a esto, la enfermedad progresa a su última etapa, el SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Humana Adquirida), en la que en la mayoría de los casos la muerte se da en un lapso de dos a tres semanas (Deeks et al., 2015; Kaplan et al., 2009; Kaplan et al., 1996).

Tratamientos contra el VIH

Actualmente la infección por VIH se trata con medicamentos denominados antiretrovirales, dirigidos hacia distintos componentes del virus, como son la retrotranscriptasa, importasa y la proteasa viral (Laskey & Siliciano, 2014). Estos son efectivos si se administran de manera individual, pero el VIH genera resistencia hacia estos, por lo cual se ha propuesto usar en combinación dos o más antiretrovirales en una terapia conocida como HAART (por sus siglas en

inglés, high active antiretroviral therapy), cuya administración ha mostrado ser efectiva para controlar la replicación viral, y actualmente se usa para controlar el estatus del virus en una persona infectada (Brechtel, Breitbart, Galietta, Krivo, & Rosenfeld, 2001; Laskey & Siliciano, 2014; D. Y. Lu et al., 2018). Entre las ventajas que ha mostrado esta terapia están principalmente: que hay una disminución en el riesgo de contagio de una persona infectada hacia una persona sana, reduce la carga viral y aumenta el tiempo de supervivencia en las personas infectadas, no obstante, la gran desventaja es que no es capaz de eliminar el virus latente en células presentes en sitios santuario (principalmente cerebro, médula ósea y ganglios linfáticos), debido a la capacidad del virus de incorporar su material genético a células CD4 en estado de dormancia (Archin, Sung, Garrido, Soriano-Sarabia, & Margolis, 2014; Churchill, Deeks, Margolis, Siliciano, & Swanstrom, 2015). Ya que los tratamientos actuales son capaces de controlar la infección viral, pero incapaces de eliminar el virus latente de las células infectadas, sigue siendo necesario generar una vacuna contra el VIH para prevenir la infección y controlar o reducir la tasa de nuevas infecciones (McMichael, 2006).

Vacunas y anticuerpos ampliamente neutralizantes

Desde que el VIH fue identificado como el agente causal del SIDA, la comunidad científica se ha dado a la tarea de generar una vacuna segura y efectiva que sea capaz de proveer inmunidad protectora capaz de evitar la infección por VIH. Muchos intentos se han llevado a cabo para poder generar esta vacuna, partiendo con enfoques clásicos donde se utiliza el virus vivo atenuado, inactivado o utilizando subunidades de proteínas virales, además del uso de herramientas de nueva generación como vacunas de ADN plasmídico y vectores recombinantes vivos (Barouch, 2008; Ensoli, Cafaro, Monini, Marcotullio, & Ensoli, 2014). Se han estudiado diversos enfoques clásicos o de nueva generación de manera individual o combinada, sin embargo, únicamente cinco han llegado a fase clínica. El gran obstáculo que ha dificultado el desarrollo de vacunas eficaces contra este virus, es que el

VIH es capaz de escapar al reconocimiento por parte del Sistema Inmunológico debido a la alta tasa mutacional de su material genético, lo que se conoce como selección clonal del VIH (Laskey, Pohlmeier, Bruner, & Siliciano, 2016; McMichael, 2006; Sanjuán, Nebot, Chirico, Mansky, & Belshaw, 2010). De hecho, solo la vacuna RV144 fue capaz de generar protección en el 32% de los individuos de alto riesgo que participaron en este estudio (Nicos Karasavvas et al., 2012; Pollara, Easterhoff, & Fouda, 2017). El mayor margen de protección generado por esta vacuna se atribuyó a su diseño de amplio espectro, ya que combina recombinantes de la gp120 con una vacuna de ADN que expresa componentes de los genes ENV y Pol (N. Karasavvas et al., 2012; Plotkin, 2010; Weiner, 2010). Aunque los resultados mostrados por la vacuna RV144 son prometedores, el margen de protección sigue siendo insuficiente, por lo que sigue siendo necesario desarrollar vacunas efectivas hacia HIV con mayor cobertura, debido a que es un problema importante de salud (Haynes et al., 2006).

Los estudios que se han realizado hasta el momento sobre la etiología del VIH han dado a los investigadores información de gran valor acerca de cómo el sistema inmunológico combate al virus. Esto ha permitido diseñar nuevas estrategias encaminadas a evitar la infección. Un ejemplo a tomar en cuenta es el papel que juegan los anticuerpos, ya que en el caso de infecciones virales son capaces de neutralizarlos evitando así la infección. En el caso particular del VIH, se ha observado que individuos ya infectados son capaces de desarrollar anticuerpos que neutralizan cepas primarias del virus. Estos anticuerpos, por esta función tan importante, se han nombrado “ampliamente neutralizantes” (Cortez et al., 2015; Mascola & Haynes, 2013). Los anticuerpos ampliamente neutralizantes de VIH, se han caracterizado a partir de la secuencia de sus paratopos y se sabe que reconocen cuatro regiones de gran importancia en la envoltura viral, que son: en la gp41, la Región Externa Próxima a la Membrana (MPER, por sus siglas en inglés) y en la gp120, el sitio quizá de mayor importancia para la infección, el sitio de reconocimiento del receptor CD4. Un ejemplo de estos anticuerpos dirigidos contra esta región es el anticuerpo b12, que es capaz de neutralizar cerca del 50% de los aislados primarios evaluados (Parren et al., 1998). Otros sitios de gran importancia en la gp120 son las asas

V1V2 y V3, hacia los cuales hay epítomos de gran importancia como lo son el C018G y el GPGRAF, capaces de neutralizar del 50 al 60% de los aislados virales evaluados (Parren et al., 1998; Spenlehauer et al., 1998; Wu et al., 1995; York et al., 2001). Se han realizado estudios además en los que se ha observado que cuando se usan combinaciones de dos o más de estos anticuerpos ampliamente neutralizantes aumenta el porcentaje de neutralización, tal es el caso del estudio de McCoy y colaboradores, en el que se observó que al combinar los anticuerpos neutralizantes 4E10 y 2F5 el porcentaje de neutralización de los aislados primarios aumentaba hasta casi el 90% (González et al., 2018; Lutje Hulsik et al., 2013).

ANTECEDENTES

Vacunas multiepitópicas

Aunque se ha observado que la gp120 es inmunogénica, el principal problema para la generación de una vacuna efectiva contra el virus es su alta tasa mutacional. Sin embargo, en la envoltura del virus existen sitios dentro de gp41 y gp120 que son sumamente conservados. Si estos sitios mutan o son bloqueados por anticuerpos, el virus pierde su capacidad de infectar las células blanco. Ejemplos de estos sitios son los ya mencionados: MPER, las asas V1, V2 y V3, así como el sitio de reconocimiento del receptor CD4. Hoy en día se han descrito un gran número de epítomos que generan anticuerpos capaces de neutralizar al virus, algunos de gran relevancia, como los contenidos en la gp120, la secuencia **RPNNNTRKSIHIGPGRIFYATE**, determinante antigénico del asa V3, que induce anticuerpos neutralizantes hacia el 30% de aislados primarios (Haynes et al 2006), las secuencias repetidas **GPGRAF** del asa V3 del HIV, que han mostrado neutralizar más de 50% de aislados primarios y el epítomo **MWQEVGKAMYAPPIEG** que es la secuencia correspondiente al sitio de unión a CD4, esta región es reconocida por anticuerpos como el **4E10**, capaz de neutralizar 98% de 108 aislados de VIH sin presentar autor reactividad (Kelker, Itri, & Valentine, 2010; Kwong et al., 1998). También hay

que destacar los epítomos que inducen anticuerpos contra la gp41 como el epítomo **ELDKWA**, que tiene la habilidad de inducir anticuerpos capaces de bloquear la transmisión viral *in vivo* en macacos, así como la secuencia **LWNWFDITNWLWK** reconocida por el anticuerpo **2F5**, que neutraliza de 40 a 50% de cepas de VIH (Broliden et al., 1992; Vanini et al., 1993).

El uso de péptidos sintéticos como vacunas tiene varias limitaciones como su baja inmunogenicidad y cobertura, mientras que los enfoques multiepitópicos permiten ampliar la cobertura.

En estudios previos del laboratorio se diseñó un péptido C4V3 recombinante triepitópico inmunogénico (Varona-Santos, Vazquez-Padron, & Moreno-Fierros, 2006). Posteriormente el diseño fue mejorado agregando más epítomos de diferentes aislados del HIV (Govea-Alonso et al., 2013) y finalmente, buscando ampliar la cobertura, se desarrolló una proteína multiepitópica que incluye epítomos de la envoltura del VIH-1 que se encuentran en los dominios C4, V1, V2 y V3 de la gp120 y además contiene epítomos de gp41 como ELDKWA y VD20 (Rubio-Infante et al., 2015). Esta proteína multiepitópica Multi-HIV se expresó en plantas de tabaco. De forma relevante esta proteína mostró ser inmunogénica por vía oral, a diferencia de otras proteínas basadas en subunidades que no lo son, ya que se lograron inducir respuestas significativas de anticuerpos hacia varios de estos epítomos. Buscando optimizar la expresión de la Multi-HIV ya que en su forma actual su expresión en *E. coli* es muy baja y en plantas es difícil su purificación a gran escala, consideramos que su expresión puede optimizarse si se expresa en un buen sistema de entrega como en partículas tipo virus (VLPs) (Lua et al., 2014; Roldao, Mellado, Castilho, Carrondo, & Alves, 2010).

Las VLPs como sistemas de entrega de antígeno y la proteína VP2 del Parvovirus humano B19

Las VLPs (o partículas tipo virus) están compuestas por las proteínas estructurales de la cápside de distintos virus, con capacidad de auto ensamblarse, pero que carecen de capacidad infecciosa debido a que no tienen material genético. Estas VLPs han mostrado ser una estrategia efectiva y segura para inducir respuestas humorales y celulares en diversas vacunas ya aprobadas, como en el caso de la del virus de papiloma humano. Muchas de estas VLPs están expresadas en células eucariontes, lo que es una limitación, debido a que la complejidad de estas partículas puede requerir de más de una proteína para formar una VLP completa, lo que se ve reflejado en el aumento en los tiempos de obtención, así como en los costos de producción (Sanchez-Rodriguez et al., 2012).

Al contrario, existen algunas VLPs cuyo sistema de expresión puede darse en procariontes, tal es el caso de la VLP VP2 del B19V, que además de poder expresarse en bacterias, pueden auto ensamblarse para formar VLPs completas en ambientes libres de células únicamente con monómeros de VP2 (Sanchez-Rodriguez et al., 2012). Otra de las grandes ventajas que ofrece la VP2, es que en su región amino terminal se pueden expresar de manera recombinante péptidos o proteínas completas, formando quimeras de esta proteína. Estas VP2 quiméricas mantienen la capacidad de auto ensamblarse, siempre y cuando se lleve a cabo con mezclas de VP2 silvestre y VP2 quiméricas. Por ejemplo, las quimeras VP2 unidas tanto a la proteína verde fluorescente como a péptidos derivados de la glicoproteína de fusión del Virus Sincitial Respiratorio, mantuvieron su capacidad de formar VLPs (Del Carmen Moran-Garcia et al., 2016; Gilbert et al., 2006). Para el caso de la quimera VP2 unida a los péptidos del virus sincitial respiratorio, se probó la capacidad de esta proteína para desplegar dos péptidos de la proteína de fusión F del RSV contra este virus y, de manera interesante al evaluar la inmunogenicidad de estas VLPs se observó que estas VLPs generaron respuestas de anticuerpos hacia estos péptidos, aunque los anticuerpos no presentaron reactividad hacia el VSR (Del Carmen Moran-Garcia et al., 2016). Se propuso también que la inducción de respuesta hacia los péptidos pudo haber sido potenciado por la

VP2 debido a su naturaleza viral que puede proveer un efecto adyuvante. Debido a todas estas ventajas que ha mostrado la proteína VP2 del B19V, puede considerarse como una herramienta prometedora para el desarrollo de vacunas, ya que ha mostrado ser un buen sistema de andamio para desplegar péptidos heterólogos en la superficie de VLPs, debido a su plasticidad para fusionar péptidos en su extremo amino terminal.

Por lo tanto, en el presente trabajo nos propusimos diseñar, y producir dos proteínas VLPs quiméricas de VP2 con múltiples epítopos de VIH-1. Estas construcciones multiepitópicas incluyen epítopos conservados de la envoltura viral del VIH-1 que son reconocidos por anticuerpos neutralizantes. La primera construcción multiepitópica fue nombrada MultiHIV-A, la cual contiene epítopos de la gp41 (epítipo ELDKWA, 4E10 y VD20), mientras que la segunda construcción está compuesta por epítopos de la gp120 (con epítopos de los dominios C4, V1, V2 y V3) fue nombrada MultiHIV-B. Ambas construcciones fueron fusionadas genéticamente a la VP2 del parvovirus humano B19 para formar quimeras de VP2 que fueron nombradas VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B}. Con estas quimeras de VP2 se evaluó tanto su capacidad para formar VLPs, así como su inmunogenicidad mediante su capacidad para inducir anticuerpos y respuestas celulares en ratones inmunizados con ambas VLPs.

JUSTIFICACIÓN

Debido a las implicaciones que trae consigo la alta tasa mutacional del virus del VIH, en la actualidad no existe una vacuna que sea capaz de evitar la infección. En consecuencia es importante generar estrategias que permitan inducir anticuerpos ampliamente neutralizantes, así como respuestas celulares de linfocitos para evitar el establecimiento de la infección por VIH.

HIPÓTESIS

Las VLPs multiepitópicas VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B} serán capaces de formar VLPs completas con actividad inmunogénica y por tanto capaces de inducir respuestas inmunes humorales y celulares hacia los epítomos del VIH contenidos.

OBJETIVOS

General

- Evaluar el potencial inmunogénico de dos construcciones multiepitópicas quimeras de VP2 (VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B}) ensambladas en VLPs

Particulares

- Clonar y expresar dos construcciones multiepitópicas contra VIH-1 fusionadas genéticamente a VP2.
- Ensamblar y caracterizar las VLPs formadas las quimeras de VP2 VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B}.
- Evaluar las respuestas humorales generadas por ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados con las VLPs multiepitópicas VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B}.
- Evaluar las respuestas celulares generadas por ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados con las VLPs multiepitópicas VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B}.

METODOLOGÍA

Diseño y síntesis de las construcciones VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B}

Para el diseño de los péptidos multiepitópicos contra el VIH-1 se tomó como antecedente directo la construcción propuesta por Rubio-Infante y colaboradores en el 2015, la cual fue modificada dividiendo los epítomos en dos construcciones nombradas MultiHIV-A y MultiHIV-B. Ambas construcciones multiepitópicas se acoplaron al extremo amino terminal de la VP2 del parvovirus B19 y se nombraron VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B}. En las figuras 5 (VP2_{MultiHIV-A}) y 6 (VP2_{MultiHIV-B}) se muestra el acomodo de los epítomos para ambas construcciones.

Se anclaron al extremo amino terminal; ya que se ha reportado que el acoplamiento en esta región de la VP2 no interfiere con su correcto plegamiento ni con su propiedad de auto ensamblarse para formar VLPs. Tanto a VP2_{MultiHIV-A} como a VP2_{MultiHIV-B} se les añadió una la etiqueta molecular de poli-histidina (poli-His) para facilitar su purificación. Una vez diseñadas, ambas construcciones fueron sintetizadas por la compañía Epoch Life Science Inc. en el vector de clonación pBSK.

Clonación de las construcciones quiméricas VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B} dentro del vector de expresión pET22b(+)

Una vez en el vector pBSK, se diseñaron oligonucleótidos específicos que hibridaban en el ORF (marco de lectura abierto, por sus siglas en inglés) de ambas construcciones tomando en cuenta los valores óptimos de porcentaje de GC (40-60%), así como de la Tm en un intervalo de 55 a 65°, una vez tomadas en cuenta estas consideraciones se les agregó sitios de reconocimiento para enzimas de restricción que corresponden a *NdeI* en el extremo 5' y *EcoRI* y *HindIII* en el extremo 3', los cuales fueron sintetizados por la empresa Sigma Aldrich. Para el caso de la construcción VP2_{MultiHIV-A} el oligonucleótido sentido fue 5' GGA GAT ATA CAT ATG GGC CTG GTA AAA CAG ATC 3' mientras

que la secuencia anti sentido fue 5' CGC AAG CTT GAA TTC AGT ATT AGT GGT GAT GGT GGT GATG 3', para el caso de VP2_{MultiHIV-B} su secuencia sentido fue 5' GGA GAT ATA CAT ATG TGG CAA GAA GTT GGC A 3' y su secuencia antisentido fue 5' CGC AAG CTT GAA TTC AGT ATT AGT GAT GAT GGT GGT GGT G 3'.

Una vez sintetizados los oligonucleótidos se llevó a cabo la PCR. En este caso se utilizó una variante llamada Touchdown (TDW). Las condiciones de reacción fueron: 200 ng de cada construcción en el vector pBSK, 0.4 μ M de cada oligonucleótido, 1.5 mM de MgCl₂, 0.4 μ M de dNTPs y 1u/ μ L de ADN polimerasa de alta fidelidad Pfu (*Pyrococcus furiosus*), el proceso se inició con un ciclo de desnaturalización a 94°C por 5 min, posteriormente se llevó a cabo el ciclo de la PCR TDW, que inició a 63°C y cada tres ciclos disminuyó 0.5°C hasta llegar a 60°C, todo por 30 s durante 18 ciclos con su respectivo ciclo de elongación de 72°C por 1 min, la finalidad de usar esta variante de PCR fue para aumentar la especificidad de los productos generados (Korbie & Mattick, 2008). Posteriormente se llevaron a cabo 17 ciclos de PCR convencional con una temperatura de alineamiento a 60°C por 30 s y elongación a 72°C por 1 min.

Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio (EtBr). Las bandas correspondientes a los productos de VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B} fueron aisladas y purificadas con el kit GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) y una vez aislados, los productos fueron cortados a la par con el vector de clonación pET22b(+) usando las enzimas de restricción *NdeI* y *EcoRI*. Las condiciones de corte con enzimas de restricción fueron las siguientes: 200 ng de los productos de VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B} recuperados, 1 μ g de pET22b(+), 2x de amortiguador Tango (Thermo Scientific), 0.3 U/ μ L de *NdeI*, 1U/ μ L de *EcoRI*. La reacción se llevó a cabo por 90 min a 37°C, y para finalizar se inactivaron ambas enzimas a 57°C por 15 min. Una vez que se tuvieron los productos cortados se corrieron en geles de agarosa al 1.5% teñidos con EtBr, subsiguientemente se recuperaron las bandas correspondientes a los productos y aislaron con el kit GeneJET Gel Extraction Kit de Thermo Scientific para proseguir con la ligación de los productos.

La ligación de los insertos correspondientes a VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B} dentro del vector de expresión pET22b(+) se llevó a cabo en una relación 1:3 inserto-vector de acuerdo a la longitud de los productos, utilizando 1U/ μ L de T4 ADN Ligasa y 1x de amortiguador T4 ADN Ligasa durante 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió a la transformación de bacterias químicamente competentes de la cepa *E. coli* DH5 α , se inocularon en placas de medio LB más 100 μ g/mL de ampicilina y se incubaron durante 16 h. posteriormente se analizaron las colonias obtenidas y las que fueron positivas para las construcciones VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B} se inocularon en medio LB líquido más 100 μ g/mL de ampicilina por 16 h. Pasado este tiempo se realizó la extracción del ADN plasmídico y se procedió a la transformación de bacterias químicamente competentes de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) para iniciar la expresión de la cada proteína.

Expresión de las construcciones quiméricas VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B}

Para la expresión de las quimeras se realizó una doble selección de colonias positivas para ambas quimeras con la finalidad de aislar la de mayor expresión. Una vez seleccionadas, se escaló el cultivo a 200 mL de medio LB y se indujo la expresión de la siguiente forma: cada una de las colonias correspondientes a VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B} se inoculó en 2 mL de medio LB con 90 μ g/mL de ampicilina y se dejó incubando toda la noche a 37°C y 200 rpm. Posteriormente esos 2 mL fueron inoculados a un volumen de 200 mL de LB+Amp y se incubó a 37°C y 200 rpm hasta llegar a una OD₆₀₀ (densidad óptica) de 0.8. Posterior a ello se añadió IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 0.3 mM para inducir la expresión de proteínas, el cultivo se dejó durante un lapso de 18 h a 30°C y 200 rpm. Pasado este tiempo se corrió un SDS-PAGE para verificar la sobreexpresión de cada proteína.

Ya corroborada la expresión de las proteínas, se centrifugó el cultivo de bacterias a 5000 rpm por 20 min a 10°C, el pellet obtenido fue resuspendió en 10 mL de amortiguador de lisis (50 mM NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl, pH 6.3) y se

prosiguió con el proceso de sonicación de las bacterias. Esto se llevó a cabo en una cama de hielo empleando pulsos de 10 s con pausas de 10 s durante un lapso de 30 min. Ya sonificado el cultivo de bacterias, se prosiguió con la obtención de los cuerpos de inclusión centrifugando a 8000 rpm por 20 min a 4°C. Posteriormente estos fueron lavados con 10 mL amortiguador de lisis adicionado con 2% de tritón con la finalidad de eliminar el excedente de membrana celular bacteriana, proceso que se repitió tres veces. Ya lavados los cuerpos de inclusión, se prosiguió con la solubilización de estos, para lo cual se emplearon 10 mL de amortiguador de lisis adicionado con 6 M de Clorhidrato de Guanidina (GuHCl) y 2 mM de Dithiothreitol (DTT), esto se incubó durante un periodo de 18 h a 37°C y 210 rpm.

Purificación de VP2MultiHIV-A y VP2MultiHIV-B

La purificación de ambas proteínas se llevó a cabo por cromatografía de afinidad, ya que tanto VP2 nativa como las construcciones VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B} tienen en su extremo carboxilo terminal un Tag de Poli-His para facilitar su purificación. Para llevar a cabo este proceso se usaron 8 mL de resina de níquel (NiNta). Esta se equilibró con 30 mL de amortiguador de equilibrio (PBS y 5 M de GuHCl). Se tomaron 2 mL de proteína solubilizada y se puso en una relación 1:3 v/v con amortiguador de equilibrio y se hizo pasar por la columna, una vez realizado este paso, se lavó la columna con 30 mL de amortiguador de lavado (PBS, 5 M GuHCl y 5 mM de Imidazol). Posteriormente se eluyó la proteína unida a la resina utilizando 8 mL de amortiguador de elución, (PBS, 5 M GuHCl y 250 mM de Imidazol) colectando fracciones de 1 mL. Ya obtenidas las fracciones se tomaron 50 µL de cada una y se pusieron a dializar por 2 h a 4°C en 15 mL de una solución 3 M de Urea, para posteriormente analizar por SDS-PAGE las fracciones donde se estaba eluyendo cada una de las quimeras de VP2. Posteriormente las fracciones donde se observó la mayor parte de las proteínas fueron concentradas en un tubo Amicon de 50,000 KDa.

“Western blot” de las quimeras VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B}

Para verificar que las proteínas expresadas correspondían a las quimeras de VP2, se llevó a cabo un “Western blot” usando un anticuerpo policlonal Anti-VP2 hecho en conejo, el procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera: para cada una de las quimeras de VP2 se corrió un SDS-PAGE y se corrió como control positivo la VP2 silvestre (donada por el Dr. Ismael Bustos Jaimes de la Facultad de Medicina U.N.A.M.), tanto para la VP2 silvestre como para las quimeras se corrieron lisados de *E. coli* antes y después de inducir la expresión de proteínas (nombrados pre y post inducción), además del solubilizado de los cuerpos de inclusión y las fracciones concentradas después de la purificación. Una vez que corrieron estos geles se llevó a cabo la transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa, estas se bloquearon toda la noche con una solución de TBS-T más 2% de leche. Al día siguiente se lavaron las membranas con TBS-T y se agregó el anticuerpo Anti-VP2, incubándose durante una hora a temperatura ambiente y movimiento constante. Posteriormente se lavó con TBS-T y se agregó el anticuerpo Anti-conejo marcado, se incubó durante una hora a temperatura ambiente y oscuridad. Pasado el tiempo, la membrana se lavó con TBS-T y se reveló en el foto documentador ODYSSEY CLx de LI-COR™.

Evaluación del ensamblaje de las quimeras VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B} por dispersión dinámica de luz (DLS)

Para el la formación de VLPs de la VP2 nativa (ensamblaje) se ha reportado que la concentración óptima es de entre 0.1 y 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, por lo cual se eligió la concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en un volumen final de 1.2 mL. Para la construcción VP2_{MultiHIV-A}, se ensambló en proporción 1:1 con la VP2 silvestre, mientras que para la construcción VP2_{MultiHIV-B} el ensamblaje se llevó a cabo únicamente con esta quimera al 100%, para ambos casos respetando la concentración y el volumen óptimos. Una vez que se tuvieron las proteínas a la concentración calculada se pasaron a bolsas de diálisis que a su vez fueron puestas dentro de tubos Falcon de 50 mL con PBS (adicionado con 0.5 M de L-Arginina). Esto

se dejó incubando durante 72 h a 4°C, haciendo cambio de amortiguador cada 12 h. Pasadas 72 h, las muestras fueron filtradas por 0.22 μm y leídas por dispersión dinámica de luz en el equipo Zetasizer μV de la compañía Malvern Panalytical. El equipo fue programado para hacer 50 lecturas de cada muestra mostrando un promedio, los datos arrojados fueron analizados en el software del Zetasizer μV 7.3 de la empresa Malvern Panalytical.

Inmunización de ratones de la cepa C57BL/6 con VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B}

Se inmunizaron ratones hembras de la cepa C57BL/6 de 11 semanas de edad. La evaluación de la inmunogenicidad de ambas quimeras se dividió en dos esquemas de inmunización separados por un periodo de tiempo de 30 días. El primer esquema, correspondiente a VP2_{MultiHIV-A}, consistió de dos grupos de ratones (n=5) que recibieron los siguientes tratamientos: 25 μg de VLPs VP2_{MultiHIV-A} ensambladas (grupo VP2_{MultiHIV-A}) y un grupo control que recibió 50 μL de PBS+0.5 M de L-Arginina (Grupo control), estos fueron inmunizados por vía intranasal los días 0, 7, 14 y 21. El segundo esquema de inmunización fue el correspondiente a la quimera VP2_{MultiHIV-B}, este consistió de dos grupos de ratones (n=5) que recibieron los siguientes estímulos: 25 μg de VLPs VP2_{MultiHIV-B} ensambladas (grupo VP2_{MultiHIV-B}) y un grupo control de 50 μL de PBS+0.5 M de L-Arginina (Grupo control), los cuales fueron administrados de manera igual que al esquema correspondiente a las VLPs VP2_{MultiHIV-A}. En ambos casos al día 28, a todos los grupos de ratonas se les realizaron lavados vaginales con 200 μL de PBS estéril para evaluar la respuesta de anticuerpos en este sitios mucosal, después fueron sacrificados los organismos y se colectó el suero mediante punción cardíaca, posteriormente se realizaron lavados de intestino grueso (para realizar lavados), con la finalidad de evaluar la producción de anticuerpos y se les extrajo el bazo con la finalidad de evaluar la proliferación celular.

Proliferación celular

Los esplenocitos fueron aislados a partir del bazo de los ratones pertenecientes a los grupos mencionados anteriormente, estos fueron disgregados en condiciones estériles. Posteriormente los eritrocitos fueron lisados empleando un amortiguador hipotónico de Cloruro de Amonio (NH_4Cl). Más adelante, las células de bazo fueron lavadas con PBS estéril para eliminar los restos de eritrocitos y se re suspendieron en medio de cultivo RPMI suplementado (1 mM de piruvato de sodio, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 2 mM de Glutamina, 25 mM de HEPES, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomina y 10 % de suero fetal bovino). Una vez lavadas y re suspendidas, las células se contaron y se colocaron 4×10^6 células por pozo en placas de poliestireno de 12 pozos y se agregó 1 mL de RPMI suplementado. Para el esquema de inmunización correspondiente a $\text{VP2}_{\text{MultiHIV-A}}$, las células fueron sometidas a un reto con 1 μg de los péptidos sintéticos C4V3 y ELDKWA, así como de las VLPs ensambladas de VP2 silvestre y $\text{VP2}_{\text{MultiHIV-A}}$ y con PBS (adicionado con 0.5 M de L-arginina) como control. Para el esquema correspondiente a MultiHIV-B, los esplenocitos fueron estimulados bajo las mismas condiciones que se mencionaron para $\text{VP2}_{\text{MultiHIV-A}}$, únicamente se cambió el estímulo de esta última por el de las VLPs $\text{VP2}_{\text{MultiHIV-B}}$ ensambladas, para ambos casos los estímulos se pusieron en contacto con las células durante un periodo de 72 h y se usaron células sin estímulos como controles negativos.

Pasadas las 72 h, las células fueron despegadas de los pozos y se lavaron las con PBA (PBS + 0.1 % de NaN_3). Posteriormente se bloquearon los receptores FC usando el anticuerpo CD16/32 durante 25 min y pasado este tiempo las células se lavaron nuevamente con PBA y se les agregaron anticuerpos monoclonales marcados con distintos fluorocromos durante 30 min. Los anticuerpos utilizados con su respectivo fluorocromo son los siguientes: CD4-Ficoeritrina Cy5, CD8-Aloficocianina y CD3+Ficoeritrina. Pasados los 30 min, se lavaron de nuevo las células con PBA, para posteriormente ser bloqueadas con paraformaldehído al 1%. Se prosiguió con el análisis por citometría de flujo en el citómetro de cuatro canales FACSCalibur. El equipo fue programado para medir un total de 50,000 eventos y se tomó como proliferación positiva a

las células en las cuales disminuyó la señal emitida por la CFSE. Los datos arrojados por el citómetro fueron analizados en el software FlowJo.

Respuesta de anticuerpos

Para evaluar la respuesta de anticuerpos hacia los epítomos incluidos en ambas quimeras se usó la técnica de ELISA (Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, por su acrónimo en inglés). Para llevarlo a cabo se usaron placas poliestireno de 96 pozos, que fueron recubiertas durante toda la noche con 1 μg de los péptidos sintéticos correspondientes a los epítomos C4V3 y ELDKWA, así como con 1 μg de VLPs ensambladas correspondientes a VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B}, así como a la VP2 silvestre. Posteriormente las placas fueron lavadas con PBS-T (PBS + Tween al 0.05%) y se bloquearon con una solución de PBS-T + albumina al 3% (para suero y lavados vaginales) o con una solución de PBS-T+ leche al 3% (para lavados intestinales) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las placas se lavaron con PBS-T y se les añadió sus correspondientes muestras de suero, lavados intestinales y lavados vaginales y se incubó durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas fueron lavadas de nuevo con PBS-T y se les agregaron sus anticuerpos secundarios, para el caso de los sueros, se incubó con anticuerpos anti ratón IgG1-HRP e IgG2A-HRP, mientras que los lavados vaginales e intestinales fueron incubados con anticuerpos anti ratón IgG-HRP e IgGA-HRP, todos durante un lapso de dos horas a 4°C. Pasado este tiempo, las placas se lavaron de nuevo, se les agregó como sustrato el ABTS+H₂O₂ y las placas fueron leídas en un lector de ELISAs (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA) a una densidad óptica de 410 nm.

Análisis estadístico

Los ensayos de proliferación celular fueron analizados mediante la prueba T de Student, mientras que los ensayos de ELISA fueron analizados por ANOVA de una vía. El análisis para ambos se llevó a cabo con el Software Graph Pad Prism a una $p < 0.05$.

RESULTADOS

Diseño de los péptidos multiepitópicos de HIV y su acoplamiento a la VP2

La selección de epítomos de VIH incluidos en el diseño de las dos construcciones multiepitópicas quimeras de VP2, se basó en la construcción multiepitópica desarrollada y expresada en plantas de tabaco por Rubio Infante *et al*, 2015. Esta construcción, llamada MultiHIV contiene dentro de su estructura las secuencias de epítomos capaces de inducir anticuerpos neutralizantes como las correspondientes a 2F5, 4E10, b12, GPGRAF, VD20, ELDKWA, C4V3, así como el correspondiente al sitio de unión al receptor CD4 presente en la gp120. Este péptido, Multi-HIV, tuvo una longitud de 308 aminoácidos. Sin embargo, tomando en consideración que en estudios previos en los que se desarrollaron VP2 quiméricas, la longitud máxima acoplada a la VP2 fue de 236 aminoácidos y se mantuvo la capacidad de ensamblarse en VLPs (Gilbert *et al.*, 2006), por lo cual se consideró conveniente dividir los epítomos de la construcción Multi-HIV original en dos construcciones quiméricas de VP2 llamadas VP2_{MultiHIV-A} (figura 5) y VP2_{MultiHIV-B} (figura 6). En cuanto al diseño, el acomodo de los epítomos de VIH fue espaciado por linkers flexibles, este trabajo fue parte de la tesis de licenciatura de Pérez Saucedo David Gilberto (2017). Los epítomos se colocaron en el extremo amino terminal de VP2, mientras que en el extremo carboxilo se colocó una etiqueta de histidinas. Una vez diseñadas las construcciones de VP2 quiméricas, VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B} se mandaron a sintetizar en la empresa Epoch Life ScienceTM.

VP2_{MultiHIV-A}

GAATTCATGGGCCTGGTAAAACAGATCATTAACATGTGGCAAGAAGTAGGCCAAAGCTATGT
-E--F--N--G--L--V--K--Q--I--I--N--M--W--Q--E--V--G--K--A--M--
ATGCCCTGCTGGCTCGTCCGAACAACAACCCCGTAAGTCCATTACATCGGTCCAGGCCG
Y--A--L--L--A--E--P--N--N--N--T--E--K--S--I--E--I--G--P--Q--E
TGCCTTCTATGCAACCGAGGCTGGTGCGAACTGGTTTGACATCACCAACTGGCTGTGGAAG
--A--F--V--A--T--E--A--G--A--N--W--F--D--I--T--N--W--L--W--K--
AAGAAGAAAGGTGCGGGTGCAAACCTGGTTCGACATCTCTAATTGGCTGTGGTATATCAAAG
-K--K--K--G--A--G--A--N--W--F--D--I--S--N--W--L--W--Y--I--K--
GCGCAGGTGGTATCAAACAGCTGCAAGCACGCGTGTGGCAGTAGAACGCTACCTGAAAGC
G--A--G--G--I--K--Q--L--Q--A--R--V--L--A--V--E--R--Y--L--K--A
TGGTGGCGGTAACGAACAGGAACTGCTGGAGCTGGACAAGTGGGCTTCTCTGTGGAACGCA
-G--G--G--N--E--Q--E--L--L--E--L--D--K--W--A--S--L--W--N--A--
GGTGGTGGTCTGAAACTGGATCAGTGGGCAGGTGGTGCAGCTCTGGATTCTGGAATGCTG
-G--G--G--L--K--L--D--Q--W--A--G--G--A--A--L--D--S--W--N--A--
GTGGCGCAGCGGCTCTGGATAAGTGGGATAACGGTGTGGTGGTGGCAGGAACTGGACAAATG
G--G--A--A--A--L--D--K--W--D--N--G--A--G--G--A--E--L--D--K--W
GGCTGCTGCGGCAATGACTTCCGTTAACAGCGCAGAAGCATCCACTGGTGCAGGTGGTGGC
--A--A--A--A--M--T--S--V--N--S--A--E--A--S--T--G--A--G--G--G--
GGTAGCAACCCGTTAAGTCTATGTGGTCTGAAGGCGCTACCTTCAGCGCAAATTCTGTGA
-G--S--N--P--V--K--S--M--W--S--E--G--A--T--F--S--A--N--S--V--
CCTGTACCTTCAGCCGTCAGTTCCTGATTCCGTACGATCCGGAGCATCACTACAAAGTGT
T--C--T--F--S--R--Q--F--L--I--P--Y--D--P--E--H--H--Y--K--V--F
CTCTCCGGCAGCTTCTTCTGTGATAACGCCTCTGGTAAAGAAGCCAAAGTGTGCACCATT
-S--P--A--A--S--S--C--H--N--A--S--G--K--E--A--K--V--C--T--I--
AGCCCGATCATGGGTTATTCTACTCCGTGGCGCTATCTGGATTTCAACGCGCTGAACCTGT
-S--P--I--M--G--Y--S--T--P--W--R--Y--L--D--F--N--A--L--N--L--
TCTTCTCTCCGCTGGAGTTCAGCACCTGATCGAAAACCTACGGTCTATTGCACCGGATGC
F--F--S--P--L--E--F--Q--H--L--I--E--N--Y--G--S--I--A--P--D--A
ACTGACTGTGACTATTTCTGAAATCGCTGTAAGACGTTACTGACAAAACCTGGCGGTGGT
--L--T--V--T--I--S--E--I--A--V--K--D--V--T--D--K--T--G--G--G--
GTTCAGGTGACTGACTCTACTACTGGTCTGTGTATGCTGGTAGATCACGAGTATAAGT
-V--Q--V--T--D--S--T--T--G--R--L--C--M--L--V--D--H--E--Y--K--
ACCCGTACGTTCTGGGCCAGGGCCAGGACACTCTGGCACCGGAGCTGCCGATCTGGGTTTA
Y--P--Y--V--L--G--Q--G--Q--D--T--L--A--P--E--L--P--I--W--V--Y
CTTTCCACCACAGTACGCATACCTGACTGTAGGTGACGTGAACACCCAAGGCATCTCCGGT
--F--P--P--Q--Y--A--Y--L--T--V--G--D--V--N--T--Q--G--I--S--G--
GACAGCAAGAACTGGCGTCTGAAGAATCTGCTTTCTATGTACTGGAACACTCCTCCTTTC
-D--S--K--K--L--A--S--E--E--S--A--F--Y--V--L--E--H--S--S--F--
AGCTGCTGGGCACTGGTGGCACCCTACCATGAGCTACAAATCCCACCAGTTCACCGGA
Q--L--L--G--T--G--G--T--A--T--M--S--Y--K--F--P--P--V--P--P--E
GAACCTGGAAGGCTGCTCCCAGCATTCTATGAAATGTACAATCCACTGTATGGCTCTCGT
--N--L--E--G--C--S--Q--H--F--Y--E--M--Y--N--P--L--Y--G--S--R--
CTGGGTGTACCGGACACCCTGGGTGGCGATCCGAAATCCGCTCTCTGACTCACGAAGACC
-L--G--V--P--D--T--L--G--G--D--P--K--F--R--S--L--T--H--E--D--
ACGCAATCCAGCCGAGAAGTTTATGCCAGGTCCGCTGGTTAACAGCGTTTCCACCAAAGA
H--A--I--Q--P--Q--N--F--M--P--G--P--L--V--N--S--V--S--T--K--E
AGGCGACTCTTCTTCTACTGGTGCAGGCAAGGCCCTGACTGGCCTGAGCACCGGCACTTCT
--G--D--S--S--S--T--G--A--G--K--A--L--T--G--L--S--T--G--T--S--
CAGAACACTCGCATCTCTCTGCGTCCGGGTCCGGTGAGCCAGCCGTACCACCATTGGGACA
-Q--N--T--R--I--S--L--R--P--G--P--V--S--Q--P--Y--H--H--W--D--
CCGACAAATACGTTACTGGCATCAACGCTATCTCCCACGGCCAGACTACCTACGGTAACGC
T--D--K--Y--V--T--G--I--N--A--I--S--H--G--Q--T--T--Y--G--N--A
AGAGGACAAAGAATACCAGCAGGGCGTTGGTTCGCTTCCCGAACGAAAAGGAACAGCTGAAA
--E--D--K--E--Y--Q--Q--G--V--G--R--F--P--N--E--K--E--Q--L--K--

CGCCTGCAAGGTCTGAACATGCACACCTACTTCCCGAACAAAGGCACCCAACAGTATACTG
 -R--L--Q--G--L--N--M--H--T--Y--F--P--N--K--G--T--Q--Q--Y--T--
 ACCAGATCGAGCGTCCGCTGATGGTTGGTTCGATGGAATCGCCGTGCTCTGCACTACGA
 D--Q--I--E--R--P--L--M--V--G--S--V--W--N--R--R--A--L--H--Y--E
 ATCCCAGCTGTGGTCTAAGATCCCGAACCTGGACGATAGCTTCAAACCCAGTTTGCGGCT
 --S--Q--L--W--S--K--I--P--N--L--D--D--S--F--K--T--Q--F--A--A--
 CTGGGTGGTTGGGGTCTGCACCAACCGCCACCGCAAATCTTTCTGAAAATCCTGCCGCAGT
 -L--G--G--W--G--L--H--Q--P--P--P--Q--I--F--L--K--I--L--P--Q--
 CCGGTCCGATTGGTGGCATCAAAGCATGGGTATCACCACCCTGGTTTCAGTATGCCGTTGG
 S--G--P--I--G--G--I--K--S--M--G--I--T--T--L--V--Q--Y--A--V--G
 CATCATGACCGTGACCATGACTTTCAAGCTGGGTCTGCGTAAAGCTACTGGTTCGCTGGAAC
 --I--M--T--V--T--M--T--F--K--L--G--L--R--K--A--T--G--R--W--N--
 CCGCAACCGGGTGTGTATCCACCGCACGCTGCTGGTTCACCTGCCGTACGTACTGTACGATC
 -P--Q--P--G--V--Y--P--P--H--A--A--G--H--L--P--Y--V--L--Y--D--
 CGACTGCTACCGACGCGAAACAGCACCACCGTCACGGTTTCGAGAAACCGGAAGAAGTGTG
 P--T--A--T--D--A--K--Q--H--H--R--H--G--F--E--K--P--E--E--L--W
 GACCGCTAAAAGCCGTGTACACCCGCTGCATCACCACCATCACCACCTAAGCATGC
 --T--A--K--S--R--V--H--P--L--H--H--H--H--H--H--H--*--A--C--

Figura 5. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la construcción VP2_{MultiHIV-A}. En negro secuencia de nucleótidos y en rojo secuencia de aminoácidos. Resaltados se muestran: en verde codón de inicio; Epítipo C4V3 en violeta; Epítipo 4E10 en rosa; Epítipo VD20 en amarillo; Epítipo ELDKWA en gris; VP2 del B19V en color azul turquesa; Tag de poli histidina en gris fuerte y codón stop en rojo; Linkers flexibles subrayados en color rojo.

VP2_{MultiHIV-B}

GAATTCATGTGGCAAGAAGTTGGCAAAGCAATGTATGCTCCACCAATCGAAGGTGGTGCTG
-E--F--N--W--Q--E--V--G--K--A--M--Y--A--P--P--I--E--G--G--A--
GCGCTGGTCCGGGTCGCGCATTTGGTCCGGGTCGTGCGTTCGGTTCGCGGTCGTGCTTTTGG
G--A--G--P--G--R--A--F--G--P--G--R--A--F--G--R--G--R--A--F--G
CGCAGGCGCAAGCACCTCCATTTCGCGGTAAGTGTCCACCAGCATCCGTGGCAAGGTTAGC
--A--G--A--S--T--S--I--R--G--K--V--S--T--S--I--R--G--K--V--S--
ACTTCTATCCGTGGTAAAGTGAGCACTTCCATCCGTGGTAAGGTATCTACCTCCATTCGTA
-T--S--I--R--G--K--V--S--T--S--I--R--G--K--V--S--T--S--I--R--
AAGTATCTACCTCTATCCGTGGCAAAGTGTCTACCTCTATTCGTGGTAAAGTTTCCACCTC
K--V--S--T--S--I--R--G--K--V--S--T--S--I--R--G--K--V--S--T--S
TATCCGTGGCAAAGTGGCTGGTGCCGGTGGTTCGTCTGTGAACCTTACCAGGCAACGCGAAA
--I--R--G--K--V--A--G--A--G--G--R--S--V--N--F--T--G--N--A--K--
ACTATCATCGTGGTGCAGGCGCAGAACAAGAGCTGCTGGAACCTGGATAAGTGGGCATCCC
-T--I--I--A--G--A--G--A--E--Q--E--L--L--E--L--D--K--W--A--S--
TGTGGAACGGTGTGGCGCAATGGGTCTGGTTAAACAGATCATCAATATGTGGCAGGAAGT
L--W--N--G--A--G--A--M--G--L--V--F--Q--I--I--N--M--W--Q--E--V
TGGTAAGGCTATGTACGCTCTGCTGGCAGCCCAAACAATAACACCCGTAAGTCTATTAC
--G--K--A--M--Y--A--L--L--A--R--F--N--N--N--T--R--K--S--I--H--
ATCGGTCCAGGCCGTGCTTTCTACGCAACTGAGGCTGCGGCAATGACCAGCGTTAACTCCG
-I--E--P--G--R--E--F--Y--E--T--E--A--A--A--M--T--S--V--N--S--
CTGAAGCGTCCACTGGTGCTGGTGGTGGTGGTTCTAACCCGGTGAAGTCCATGTGGAGCGA
A--E--A--S--T--G--A--G--G--G--G--S--N--P--V--K--S--M--W--S--E
AGGCGCTACCTTACGCGCAACTCTGTACCTGTACTTTCTCCCGTCAGTTCCTGATCCCG
--G--A--T--F--S--A--N--S--V--T--C--T--F--S--R--Q--F--L--I--P--
TACGACCCGGAACACCACTACAAAGTGTCTCTCCGGCTGCCAGCTCTTGTACACAACGCTT
-Y--D--P--E--H--H--Y--K--V--F--S--P--A--A--S--S--C--H--N--A--
CTGGCAAAGAGGCTAAAGTTGTACCATCTCTCCGATCATGGGTTACAGCACTCCGTGGCG
S--G--K--E--A--K--V--C--T--I--S--P--I--M--G--Y--S--T--P--W--R--
TTACCTGGATTTCAACGCGCTGAACCTGTTCTTCCAGCCCACTGGAATTTCCAGCATCTGATC
--Y--L--D--F--N--A--L--N--L--F--F--S--P--L--E--F--Q--H--L--I--
GAAACTATGGCTCTATCGCACCGGATGCGCTGACCGTAACCATCAGCGAAATTGCGGTAA
-E--N--Y--G--S--I--A--P--D--A--L--T--V--T--I--S--E--I--A--V--
AAGATGTTACCGACAAAAGTGGTGGTGGTGGTTCAGGTTACTGATTCTACTACTGGTCTGCT
K--D--V--T--D--K--T--G--G--G--V--Q--V--T--D--S--T--T--G--R--L--
GTGTATGCTGGTTGACCACGAGTACAAGTACCCGTATGTGCTGGGTCAGGGCCAGGATACC
--C--M--L--V--D--H--E--Y--K--Y--P--Y--V--L--G--Q--G--Q--D--T--
CTGGCACCAGAGCTGCCGATCTGGGTTTACTTTCCGCCACAGTATGCCTATCTGACTGTGG
-L--A--P--E--L--P--I--W--V--Y--F--P--P--Q--Y--A--Y--L--T--V--
GTGATGTGAACACCCAGGGCATTAGCGGTGACAGCAAGAACTGGCGTCCGAGGAGTCTGC
G--D--V--N--T--Q--G--I--S--G--D--S--K--K--L--A--S--E--E--S--A--
GTTCTACGTGCTGGAACACTCTAGCTTCCAGCTGCTGGGTACTGGTGGCACCAGGACCATG
--F--Y--V--L--E--H--S--S--F--Q--L--L--G--T--G--G--T--A--T--M--
TCCTACAAGTTTCCACCAGTGCCACCAGAAAACCTGGAAGGCTGTTCCAGCATTTTCTACG
-S--Y--K--F--P--P--V--P--P--E--N--L--E--G--C--S--Q--H--F--Y--
AAATGTACAATCCGCTGTATGGTTCCCGTCTGGGCGTGCCGGATACCCCTGGGTGGTGACCC
E--M--Y--N--P--L--Y--G--S--R--L--G--V--P--D--T--L--G--G--D--P--
AAAGTTCCGTTCTCTGACCCACGAGGACCACGCGATCCAACCGCAGAATTTTCATGCCAGGT
--K--F--R--S--L--T--H--E--D--H--A--I--Q--P--Q--N--F--M--P--G--
CCGCTGGTTAACTCTGTTTCCACCAAGGAAGGTGACTCTTCCCTCCACTGGTGGTGGCAAAG
-P--L--V--N--S--V--S--T--K--E--G--D--S--S--S--T--G--A--G--K--
CGCTGACTGGCCTGTCTACTGGTACTTCTCAGAACACCCGCATCTCTCTGCGTCCAGGTCC
A--L--T--G--L--S--T--G--T--S--Q--N--T--R--I--S--L--R--P--G--P--
GGTGTCTCAGCCGTACCACCACTGGGATACCGACAAATACGTTACTGGCATCAACGCGATC
--V--S--Q--P--Y--H--H--W--D--T--D--K--Y--V--T--G--I--N--A--I--

AGCCACGGCCAGACCACCTACGGTAACGCCGAAGACAAGGAATACCAGCAGGGCGTGGGTC
 -S--H--G--Q--T--T--Y--G--N--A--E--D--K--E--Y--Q--Q--G--V--G--
 GTTTCCCGAACGAGAAAGAACAGCTGAAGCGCCTGCAAGGTCTGAACATGCACACCTATTT
 R--F--P--N--E--K--E--Q--L--K--R--L--Q--G--L--N--M--H--T--Y--F
 CCCGAACAAAGGCACCCAGCAGTACACTGATCAGATCGAACGTCCGCTGATGGTTGGTAGC
 --P--N--K--G--T--Q--Q--Y--T--D--Q--I--E--R--P--L--M--V--G--S--
 GTGTGGAACCGTCGTGCTCTGCACTACGAGTCTCAACTGTGGTCCAAGATTCCGAACCTGG
 -V--W--N--R--R--A--L--H--Y--E--S--Q--L--W--S--K--I--P--N--L--
 ATGACAGCTTCAAACCCAATTTCGCTGCTCTGGGTGGTTGGGGTCTGCACCAACCACCACC
 D--D--S--F--K--T--Q--F--A--A--L--G--G--W--G--L--H--Q--P--P--P
 GCAAATCTTCTGAAGATTCTGCCGAGAGCGGTCCGATTGGTGGTATCAAAGCATGGGT
 --Q--I--F--L--K--I--L--P--Q--S--G--P--I--G--G--I--K--S--M--G--
 ATTACCACCTGGTACAATATGCCGTAGGTATCATGACCGTGACCATGACCTTCAAACCTGG
 -I--T--T--L--V--Q--Y--A--V--G--I--M--T--V--T--M--T--F--K--L--
 GCCTGCGTAAGGCGACTGGTTCGCTGGAACCCGCAACCGGGTGTGTATCCGCCACATGCGGC
 G--L--R--K--A--T--G--R--W--N--P--Q--P--G--V--Y--P--P--H--A--A
 TGGTCACCTGCCGTACGTGCTGTACGATCCGACTGCGACTGACGCAAAACAGCATCACCGT
 --G--H--L--P--Y--V--L--Y--D--P--T--A--T--D--A--K--Q--H--H--R--
 CATGGCTTTGAAAAGCCGGAAGAGCTGTGGACTGCGAAAATCCCGTGTTCACCCGCTGCACC
 -H--G--F--E--K--P--E--E--L--W--T--A--K--S--R--V--H--P--L--H--
 ACCACCATCATCACTAAGCATGC
 H--H--H--H--H--H--*--A--C-

Figura 6. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la construcción VP2_{MultiHIV-B}. En negro secuencia de nucleótidos, en rojo secuencia de aminoácidos. Resaltados se muestran: Codón de inicio en verde; Epítipo del sitio de unión al receptor CD4 en rosa; Epítipo GPGRAF en azul; Epítipo C108g en amarillo; Epítipo b12 en gris claro; Epítipo correspondiente al sitio de unión al receptor CD4 en verde fuerte; Epítipo C4V3 en violeta; VP2 del B19V en turquesa; Tag de poli histidina en gris fuerte y codón stop en rojo. Linkers flexibles subrayados en color rojo.

Diseño de oligonucleótidos y clonación de las quimeras de VP2 VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B}

La estrategia utilizada para llevar a cabo la clonación fue a partir de productos de PCR, para lo cual se diseñaron oligonucleótidos específicos que hibridaban en el ORF (marco de lectura abierto) de ambas construcciones y se les añadió secuencias correspondientes para las enzimas de restricción *NdeI* en el extremo 5' y *EcoRI-HindIII* en el extremo 3' (figura 7). Para el diseño se utilizó el programa Primer3, los valores obtenidos para cada par de oligos en cuanto a porcentaje de GC estuvo dentro del rango recomendado (entre 40 y 60%) y los valores de la Tm para los cuatro oligonucleótidos fue de 58°C. Posteriormente se hizo un análisis de complementariedad entre los oligonucleótidos sentido y

antisentido con el programa Oligocalc y, según los datos proporcionados, no había riesgo de complementariedad entre oligos, para ambas construcciones (no mostrado). Además se realizó un análisis de auto complementariedad de cada oligonucleótido con el programa PriDimerCheking y según los datos arrojados es alta la probabilidad de formación de dímeros entre oligonucleotidos para los oligos sentido de ambas construcciones.

VP2 _{MultiHIV-A-F}	Sentido	GGAGATATACATATGGGCCTGGTAAAACAGATC
VP2 _{MultiHIV-A-R}	Antisentido	CGCAAGCTTGAATTCAGTATTAGTGGTGATGGTGGTGATG
VP2 _{MultiHIV-B-F}	Sentido	GGAGATATACATATGGCAAGAAGTTGGCA
VP2 _{MultiHIV-B-R}	Antisentido	CGCAAGCTTGAATTCAGTATTAGTGGTGATGGTGGTGGTG

Figura 7. Oligonucleotidos diseñados para amplificar por PCR las construcciones VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B}. En color gris marco abierto de lectura (ORF); en letras verdes codón de inicio; codón de stop letras en color rojo; subrayado en color negro la secuencia correspondiente al sitio de corte de la enzima *NdeI*; subrayado en color turquesa secuencia correspondiente en el sitio de corte de la enzima *EcoRI*.

Debido a los altos valores de auto complementariedad obtenidos para los oligos, se decidió llevar a cabo una variante de PCR llamada Touchdown, esto con la finalidad de promover la amplificación específica y a su vez disminuir la formación de productos inespecíficos o dímeros que pudieran interferir con el proceso de clonación, como se puede observar en el segundo carril de las figuras 8 y 9, las bandas correspondientes a los productos de PCR de VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B} se enriquecieron y la cantidad de productos inespecíficos fue mínima.

Una vez obtenidos los productos de PCR para ambas construcciones, se cortó el material genético de estas a la par con el vector de expresión pET22b(+) con las enzimas de restricción *NdeI* y *EcoRI* (figuras 8 y 9) con la finalidad de formar extremos cohesivos, estos, se corrieron en un gel de agarosa, se

recuperaron y purificaron. A partir de estos productos puros se llevó a cabo la clonación. Para la construcción VP2_{MultiHIV-A} se logró clonar en el vector de expresión a partir del producto de PCR (figura 8 carril III), sin embargo para la construcción VP2_{MultiHIV-B} no se logró clonar en el vector de expresión (No mostrado), por lo cual se llevó a cabo una subclonación de esta construcción en el vector de clonación pJet1.2 a partir del producto de PCR no cortado (figura 9 carril III). Una vez que se verificó la correcta inserción del producto de VP2_{MultiHIV-B} en el vector clonación se prosiguió con el tratamiento de restricción con las enzimas *NdeI* y *EcoRI* (de este último) a la par con el vector de clonación pET22b(+). Posteriormente, ambos se corrieron en un gel de agarosa, se recuperaron, purificaron y se prosiguió con la clonación. En la figura 9 carril IV se muestra la correcta clonación de la construcción VP2_{MultiHIV-B} en el vector de expresión.

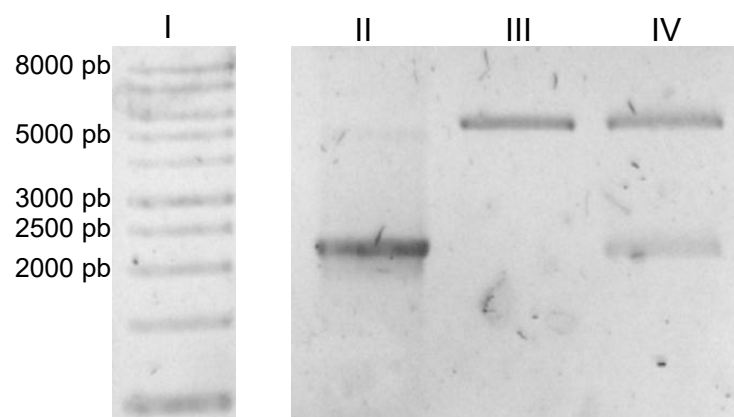


Figura 8. Clonación de la construcción VP2_{MultiHIV-A}. Se muestra un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (EtBr) en I) Marcador de peso molecular (MP), II) Producto de amplificación por PCR correspondiente a VP2_{MultiHIV-A} tratado con las enzimas de restricción *NdeI-EcoRI*, con un tamaño de 1284 pb y III) Vector pET22b(+) tratado con las enzimas de restricción *NdeI-EcoRI*, IV) ADN vectorial producto de ligación de II) y III) extraído de la cepa bacteriana *E. coli* BL21(DE3), este ADN fue tratado con las enzimas de restricción *NdeI-EcoRI*, se observan los tamaños correspondientes al vector pET22b(+) de 5397 pb y VP2_{MultiHIV-A} con un tamaño de 2178 pb.

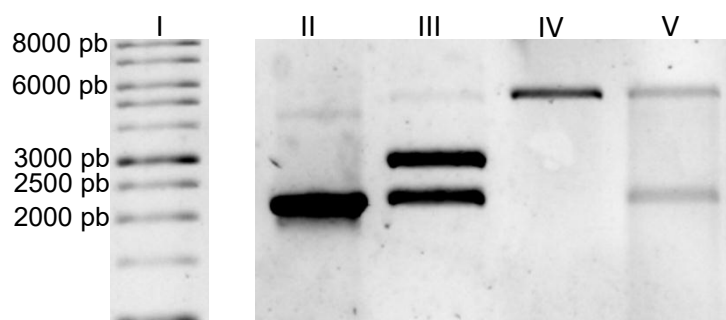


Figura 9. Clonación de $VP2_{MultiHIV-B}$. Se muestra un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (EtBr) en I) Marcador de peso molecular (MP), II) Producto de amplificación por PCR correspondiente a $VP2_{MultiHIV-B}$ con un tamaño de 2273 pb, III) ADN vectorial producto de ligación de II) en el vector de clonación pJet1.2, este ADN fue extraído de la cepa bacteriana *E. coli* DH5 α y (+) y se trató con las enzimas de restricción *NdeI-EcoRI*, la banda correspondiente al vector pJet1.2 con un tamaño de 2980 pb y la banda correspondiente a la quimera $VP2_{MultiHIV-B}$ con un peso de 2273 pb. IV) Vector pET22b(+) tratado con las enzimas de restricción *NdeI-EcoRI*, con un peso de 5397 pb V), ADN vectorial producto de ligación de la banda de 2273 pb correspondiente a $VP2_{MultiHIV-B}$ mostrada en III) y el vector pET22b(+) mostrado en IV, el cual tiene un tamaño de 5397 pb., el ADN mostrado en este carril se extrajo de la cepa bacteriana *E. coli* BL21(DE3) y se trató con las enzimas de restricción *NdeI-EcoRI*.

Secuenciación de las construcciones $VP2_{MultiHIV-A}$ y $VP2_{MultiHIV-B}$

Una vez dentro del vector de expresión, se prosiguió con el análisis de secuenciación de los insertos correspondientes a las secuencias de $VP2_{MultiHIV-A}$ y $VP2_{MultiHIV-B}$ con la finalidad de conocer si se habían generado mutaciones durante los ciclos de PCR o durante la transformación de bacterias con cada uno de los vectores. Este análisis es sumamente importante ya que cambios en nucleótidos puede alterar la secuencia de alguno de los epítopos contra HIV que fueron seleccionados o en el peor de los casos, interferir con la correcta expresión a nivel de proteína. La secuenciación que se llevó a cabo fue de tipo Sanger y para ambas construcciones arrojó una correspondencia del 100% a nivel de nucleótido con respecto a la secuencia esperada (figuras suplementarias 1 y 2).

Expresión de las quimeras de VP2 VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B}

El vector de expresión pET22b(+), en el cual fueron insertadas las secuencias de las construcciones VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B} está bajo el control del represor LacI presente en las bacterias de la cepa BL21(DE3). Debido a esto, no se puede llevar a cabo la transcripción de manera constitutiva, no obstante, este proceso puede desencadenarse añadiendo un análogo de la lactosa como el IPTG. Para inducir la expresión de ambas quimeras, en este trabajo se utilizó el análogo de la lactosa IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) y de acuerdo a lo ya reportado por Sanchez-Rodriguez y colaboradores, para la expresión de la VP2 silvestre se requiere una concentración <0.5 mM de esta molécula. Por lo cual se realizó una curva de concentración de IPTG de 0.1 a 0.6 mM (no mostrado) y se observó que en el rango de concentración de 0.3 a 0.6 mM no se observa diferencia en la cantidad de proteína expresada, por lo cual se decidió utilizar la concentración de 0.3 mM.

Una vez expresada, se ha reportado que la VP2 se acumula en cuerpos de inclusión, cuando estos son obtenidos, se someten a un proceso de lavado para eliminar proteínas inespecíficas adheridas a ellos y posteriormente se solubilizan en clorhidrato de guanidina (GuHCl) (Sanchez-Rodriguez et al., 2012). En contraste para lo observado para la VP2 silvestre, se observó que para las quimeras VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B} hubo un cambio en la solubilidad, ya que la solubilización se daba desde los lavados de los cuerpos de inclusión (figura 10a y 10b carril IV). Por lo cual, para la obtención de los cuerpos de inclusión de ambas quimeras se eliminó el lavado de los cuerpos de inclusión con urea y se solubilizó directamente en GuHCl para la obtención de las quimeras de VP2 (figura 11 carril III).

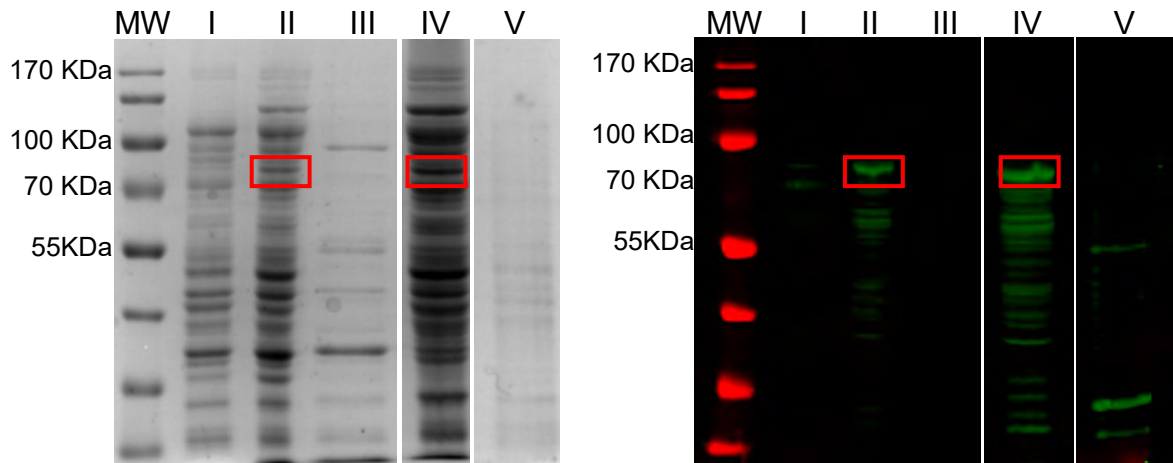


Figura 10. Cambio en la solubilidad de la quimera VP2_{MultiHIV-B}. Gel de poliacrilamida al 1% con su contraparte en “Western blot” de la quimera de VP2 VP2_{MultiHIV-B}. MW: Marcador de peso molecular; I: Lisado total de bacterias antes de agregar IPTG (pre inducción); II: Lisado total de bacterias 16 horas después de haber agregado IPGT (post inducción); III: Lavado de los cuerpos de inclusión con amortiguador de lisis; IV: Lavado de los cuerpos de inclusión con amortiguador de lavado (adicionado con Urea); V: Solubilización de los cuerpos de inclusión con 6 M de GuHCl. En rectángulo rojo se muestra la banda correspondiente a la expresión de la quimera VP2_{MultiHIV-B}, con un peso teórico de 83 KDa. El “Western blot” se reveló con anticuerpo anti VP2.

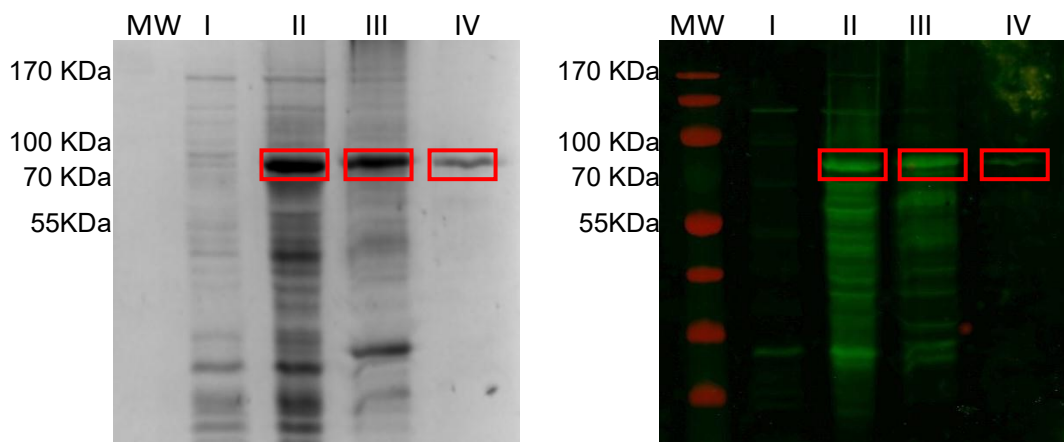


Figura 11. Modificación del protocolo para la obtención de los cuerpos de inclusión para la quimera VP2_{MultiHIV-A}. Gel de poliacrilamida al 1% con su contraparte en “Western blot” de la quimera VP2_{MultiHIV-A}. MW: Marcador de peso molecular; I: Lisado total de bacterias antes de agregar IPTG (pre inducción); II: Lisado total de bacterias 16 horas después de haber agregado IPGT (post inducción); III: Lavado de los cuerpos de inclusión con amortiguador de lisis; IV: Solubilización de los cuerpos de inclusión con 6 M de GuHCl. En rectángulo rojo se muestra la banda correspondiente a la expresión de la quimera VP2_{MultiHIV-B}, con un peso teórico de 83 KDa.

“Western blot” hacia las quimeras VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B}

Para caracterizar la correspondencia de ambas quimeras se utilizó un anticuerpo Anti-VP2. Se usó como control positivo la VP2 silvestre cuyo peso teórico de 63 KDa (figura 12a y 12b). Se calculó el peso teórico para ambas quimeras de VP2, para el caso de VP2_{MultiHIV-A} el peso esperado es de 80 KDa, mientras que para la quimera VP2_{MultiHIV-B} el tamaño teórico calculado es de 83 KDa. En las figuras 12 y 13 se observa el reconocimiento del anticuerpo Anti-VP2 hacia las bandas correspondientes a ambas construcciones, lo cual concuerda con el peso calculado para ambas proteínas. Para ambas quimeras se muestra la banda correspondiente a VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B} purificadas por cromatografía de afinidad (figuras 12 y 13 carril 8), a partir de estas, se inició el ensamblaje para la formación de VLPs.

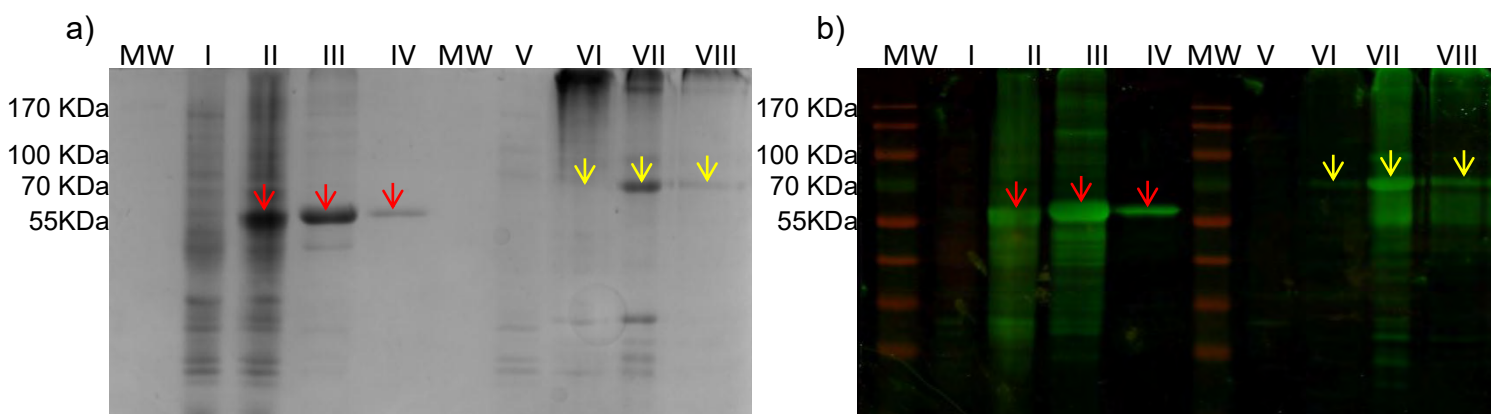


Figura 12. Caracterización de la quimera VP2_{MultiHIV-A} mediante “Western blot”. a) Gel de poliacrilamida al 1% con su contraparte en b) “Western blot”. Para la VP2 silvestre carriles I-IV y la quimera VP2_{MultiHIV-A} carriles V-VIII. Para el caso de “Western blot” se utilizó un anticuerpo Anti-VP2 hecho en conejo. MW: Marcador de peso molecular (MW); I y V: Lisado total de bacterias recombinantes de VP2 silvestre (I) y VP2_{MultiHIV-A} (V) antes de agregar IPTG (pre inducción); II y VI: Lisado total de bacterias recombinantes de VP2 silvestre (II) y VP2_{MultiHIV-A} (VI) 16 horas después de haber agregado IPTG (post inducción); III y VII: Solubilización de los cuerpos de inclusión de VP2 silvestre (III) y VP2_{MultiHIV-A} (VII) en 6 M de GuHCl. IV y VIII: VP2 silvestre (IV) y VP2_{MultiHIV-A} (VIII) purificadas, la purificación se llevó a cabo por cromatografía de afinidad en una columna de níquel. VP2 silvestre marcada con flechas en color rojo, mientras que la quimera VP2_{MultiHIV-A} se muestra en flechas de color amarillo.

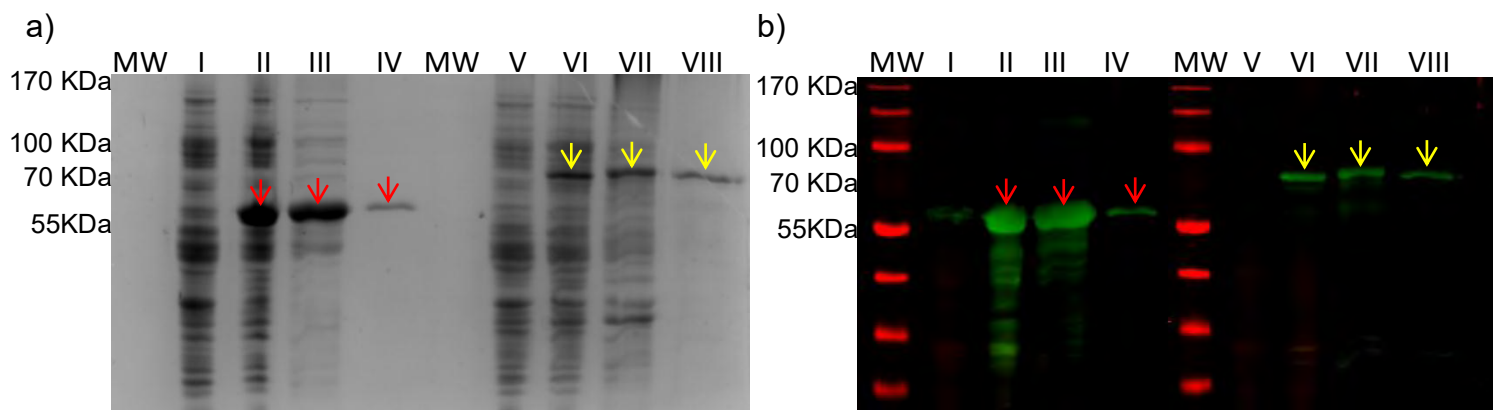


Figura 13. Caracterización de la quimera VP2_{MultiHIV-B} mediante “Western blot”. a) Gel de poliacrilamida al 1% con su contraparte en b) “Western blot” para la VP2 silvestre (carriles I-IV) y para la quimera VP2_{MultiHIV-B} (carriles V-VIII). Para el caso del “Western blot” se utilizó un anticuerpo Anti-VP2 hecho en conejo. MW: Marcador de peso molecular (MW); I y V: Lisado total de bacterias recombinantes de VP2 silvestre (I) y VP2_{MultiHIV-B} (V) antes de agregar IPTG (pre inducción); II y VI: Lisado total de bacterias recombinantes de VP2 silvestre (II) y VP2_{MultiHIV-B} (VI) 16 horas después de haber agregado IPTG (post inducción); III y VII: Solubilización de los cuerpos de inclusión de VP2 silvestre (III) y VP2_{MultiHIV-B} (VII) con 6 M de GuHCl. IV y VIII: VP2 silvestre (IV) y VP2_{MultiHIV-B} (VIII) purificadas, posterior a la purificación por cromatografía de afinidad en una columna de níquel. VP2 silvestre en flechas color rojo, VP2_{MultiHIV-B} en flechas color amarillo.

Ensamblaje y dispersión dinámica de luz de las VLPs de VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B}

Para ensamblar las proteínas VP2 y formar VLPs es importante utilizar la proteína purificada y desnaturalizada en 6 M de GuHCl. Este proceso se lleva a cabo mediante diálisis contra PBS adicionado con arginina. Bajo este procedimiento, la VP2 silvestre se repliega de manera gradual y una vez re naturalizada se une a otras subunidades de VP2 para la formación de VLPs. Para esto se requieren aproximadamente 60 subunidades de VP2 para formar una VLP promedio. Nuevamente se usó como control positivo la VP2 silvestre, para la que se ha reportado que el tamaño de las VLPs se encuentra en un rango de 18 a 32 nm, en la figura 14d se muestra el tamaño promedio de las VLPs de VP2 silvestre que se evaluaron en este trabajo, las cuales tuvieron un tamaño promedio de 27 nm, que cae dentro del rango ya reportado para las

VLPs de VP2. Adicionalmente se evaluó la estabilidad de estas VLPs de VP2 con respecto al tiempo durante un periodo de 56 días. Como se puede observar en la figura 14, la VP2 mantuvo su estabilidad, ya que el tamaño se mantuvo en el rango promedio durante este periodo de tiempo.

Para el caso de las VLPs formadas por la quimera VP2_{MultiHIV-A} no se logró ensamblar solo con proteínas de esta quimera (No mostrado), por lo cual se utilizó la proteína VP2 nativa como proteína accesoria en proporción 1:1 con la quimera VP2_{MultiHIV-A} con la finalidad de favorecer el ensamblaje. Fue bajo estas condiciones donde se logró ensamblar esta quimera (figura 15b), se puede observar que las VLPs formadas mostraron un tamaño promedio menor al de la VP2 silvestre (24.22 nm). En contraste, la quimera VP2_{MultiHIV-B} fue ensamblada con el 100% de esta proteína sin necesidad de utilizar la VP2 nativa como proteína accesoria, en la figura 15c se puede observar que el tamaño promedio de las VLPs formadas con esta quimera fue de 30.09 nm, mayor al reportado para la VP2 silvestre, aunque dentro del rango reportado.

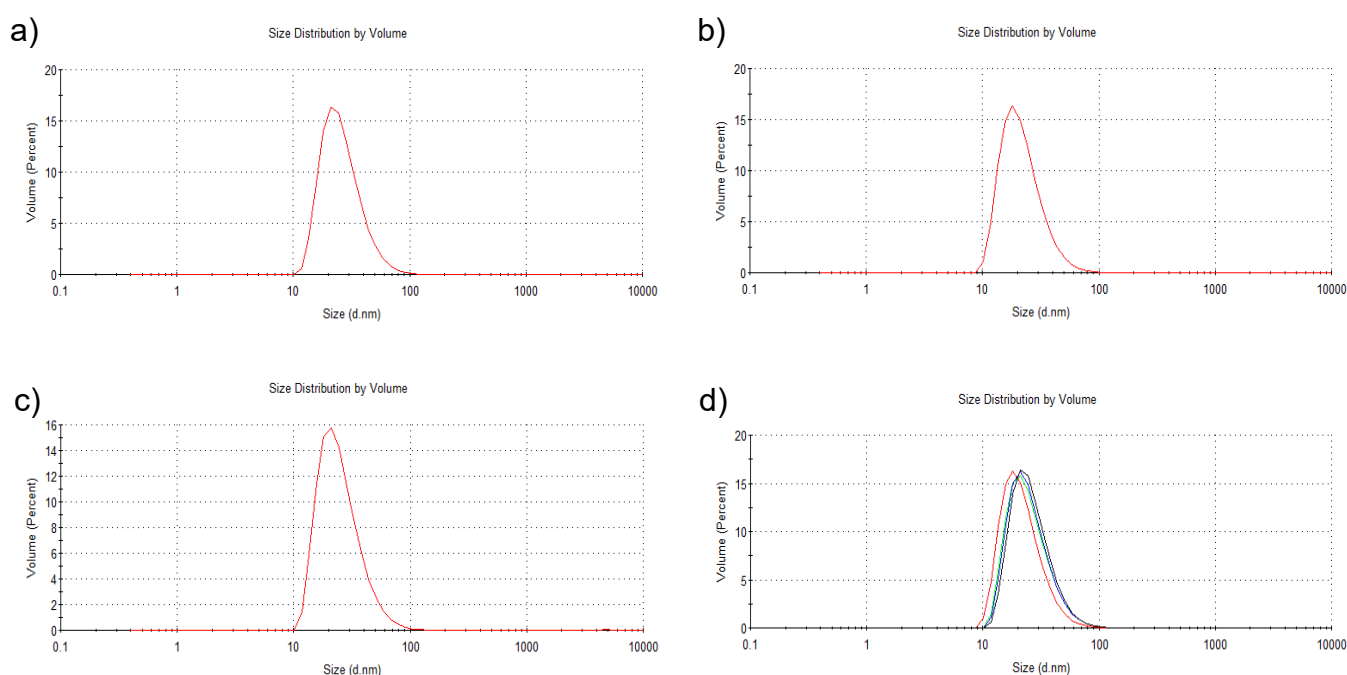


Figura 14. Evaluación de la estabilidad de la proteína VP2 con respecto al tiempo. La evaluación se llevó a cabo a partir de un mismo lote de VLPs de VP2, se midió el tamaño de las partículas mediante DLS durante un lapso de 35 días, el resultado se muestra en forma de curva. a) Medición del tamaño de partícula de la proteína VP2 hecha el día 20 de octubre del 2017. b) Segunda medición del tamaño de partícula de la VP2 realizada el día 10 de noviembre

del 2017. c) tercera medición del tamaño de partícula de VP2 realizada el día 24 de noviembre del 2017. d) Diagrama general de las lecturas de a) en negro, b) en verde y c) en rojo.

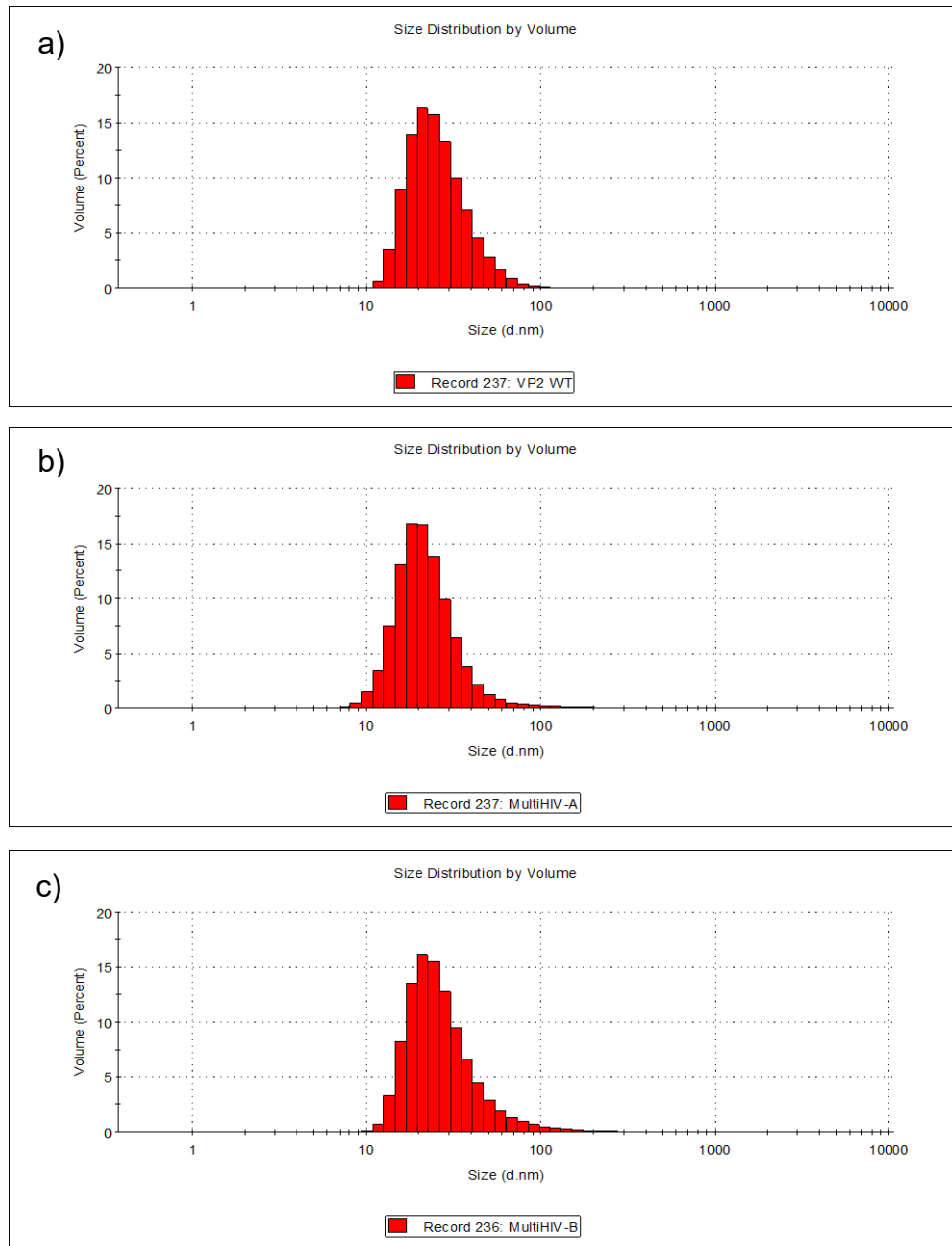


Figura 15. VLPs de VP2 nativa, VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B}. El tamaño de las VLPs se analizó por dispersión dinámica de luz (DLS), el resultado de la medición por DLS de las partículas se muestra en grafica de barras. a) VLPs de VP2 silvestre; b) VLPs de VP2_{MultiHIV-A} y c) VLPs de VP2_{MultiHIV-B}

Evaluación de las respuestas celulares tras la inmunización de las VLPs de VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B}

Se evaluaron las respuestas celulares de linfocitos CD4 y CD8 inducidas por las VLPs VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B} al inmunizar por vía intranasal en ratones hembras de la cepa C57BL/6. Los esplenocitos de bazo obtenidos después de sacrificar los organismos tratados con ambas VLPs fueron re estimulados *in vitro* con los péptidos correspondientes a los epítomos C4V3 y ELDKWA, con la VP2 nativa, así como para cada una de las VLPs quiméricas. En los ensayos de proliferación evaluados tras el estímulo con los péptidos C4V3 y ELDKWA de ratones inmunizados con ambas VLPs, se observó un ligero aumento tanto en la proporción de células CD4 como de células CD8. Sin embargo este cambio no es significativo con respecto a los que fueron inmunizados únicamente con el vehículo PBS ($p < 0.05$) (figuras 16, 17, 18 y 19). En contraste, en estas mismas células de bazo de ratones inmunizados con ambas VLPs y re estimulados con VLPs de VP2 silvestre mostraron un ligero aumento en el porcentaje de células en proliferación, tanto del linaje CD4+ como de las células CD8+, en ambos casos con respecto a ratones tratados con el vehículo PBS.

Los esplenocitos de los bazos de ratones que fueron inmunizados con las VLPs VP2_{MultiHIV-A} se observó un aumento de 0.07% en la proliferación de células CD4 (figura 16) y un aumento del 0.05% en la proliferación de células CD8 (figura 17) con respecto a esplenocitos de ratones que fueron inmunizados únicamente con el vehículo, en ambos casos tras re estimular los esplenocitos con las VLPs de VP2_{MultiHIV-A}, sin embargo para ambos linajes celulares la diferencia no mostro ser significativa ($p < 0.05$).

Con respecto al re estímulo de esplenocitos de ratones que fueron inmunizados con las VLPs de VP2_{MultiHIV-B} se observó un aumento significativo en la proliferación tanto de linfocitos CD4 como de CD8. Para el caso de los linfocitos CD4 hubo un aumento de aproximadamente el 2% en ratones que recibieron este tratamiento con respecto a los que recibieron el vehículo PBS (figura 18), lo mismo se observó para el linaje de células CD8 donde se hubo un aumento de 0.8% en las células de bazo de ratones inmunizados y re estimulados con esta quimera, en comparación con los tratados con el vehículo (figura 19).

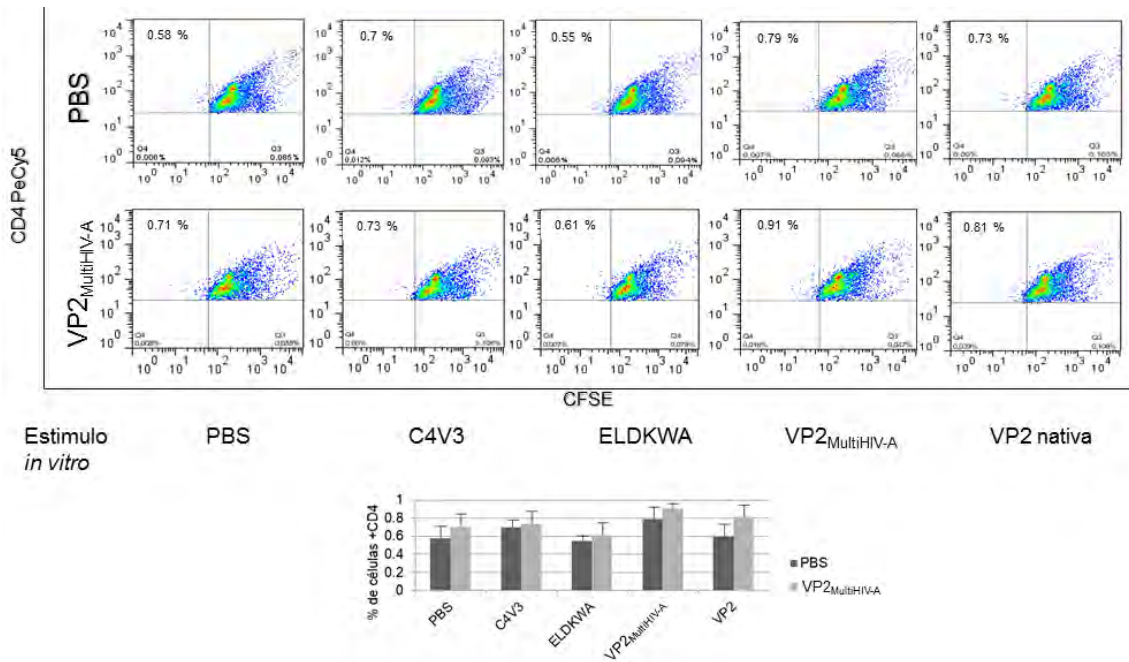


Figura 16. Evaluación de las respuestas proliferativas de células CD4⁺ de ratones inmunizados con VLPs de VP2_{MultiHIV-A} por vía intranasal. Los ratones recibieron cuatro inmunizaciones de 25 µg de VLPs de VP2_{MultiHIV-A} por vía intranasal y fueron sacrificados 7 días después de la última inmunización. Se obtuvieron células de bazo y fueron marcadas con CFSE, estas se incubaron durante 72 h con los siguientes estímulos: péptidos de VIH (C4V3 y ELDKWA), VLPs de VP2_{MultiHIV-A} y VLPs de VP2 silvestre. En la figura se muestran dot plots representativos de citometría de flujo y graficas de barras con el porcentaje de células en proliferación.

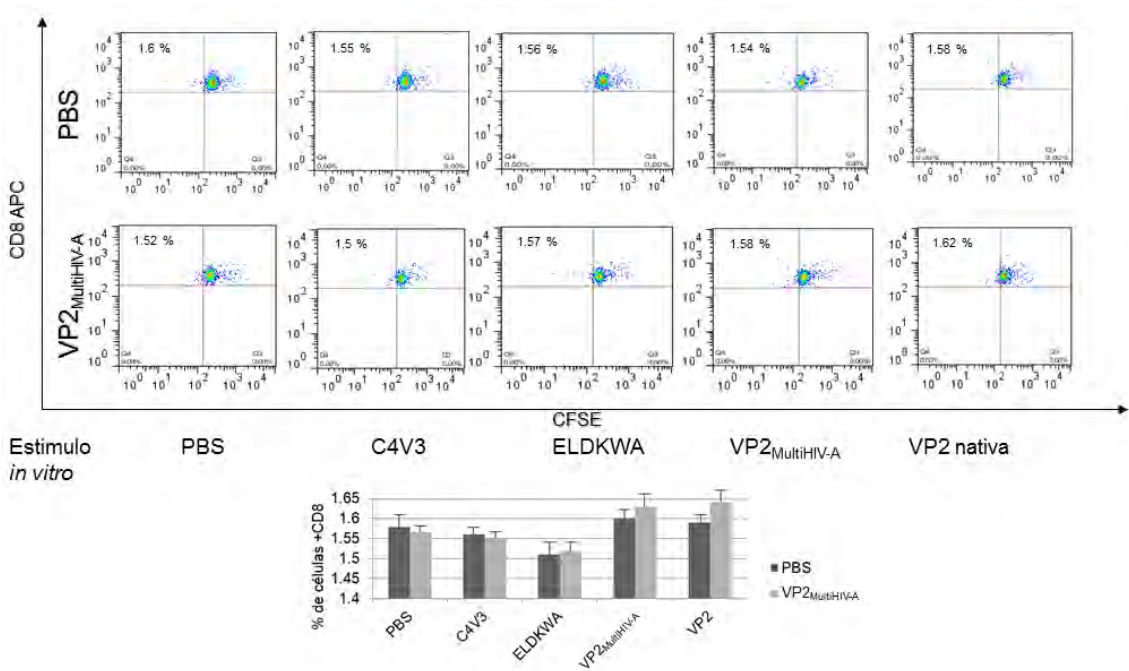


Figura 17. Evaluación de las respuestas proliferativas de células CD8+ de ratones inmunizados con VP2_{MultiHIV-A} por vía intranasal. Los ratones recibieron cuatro inmunizaciones de 25 µg de VLPs de VP2_{MultiHIV-A} por vía intranasal y fueron sacrificados 7 días después de la última inmunización. Se obtuvieron células de bazo y fueron marcadas con CFSE, estas se incubaron durante 72 h con los siguientes estímulos: péptidos de VIH (C4V3 y ELDKWA), VLPs de VP2_{MultiHIV-A} y VLPs de VP2 silvestre. En la figura se muestran dot plots representativos de citometría de flujo y graficas de barras con el porcentaje de células en proliferación.

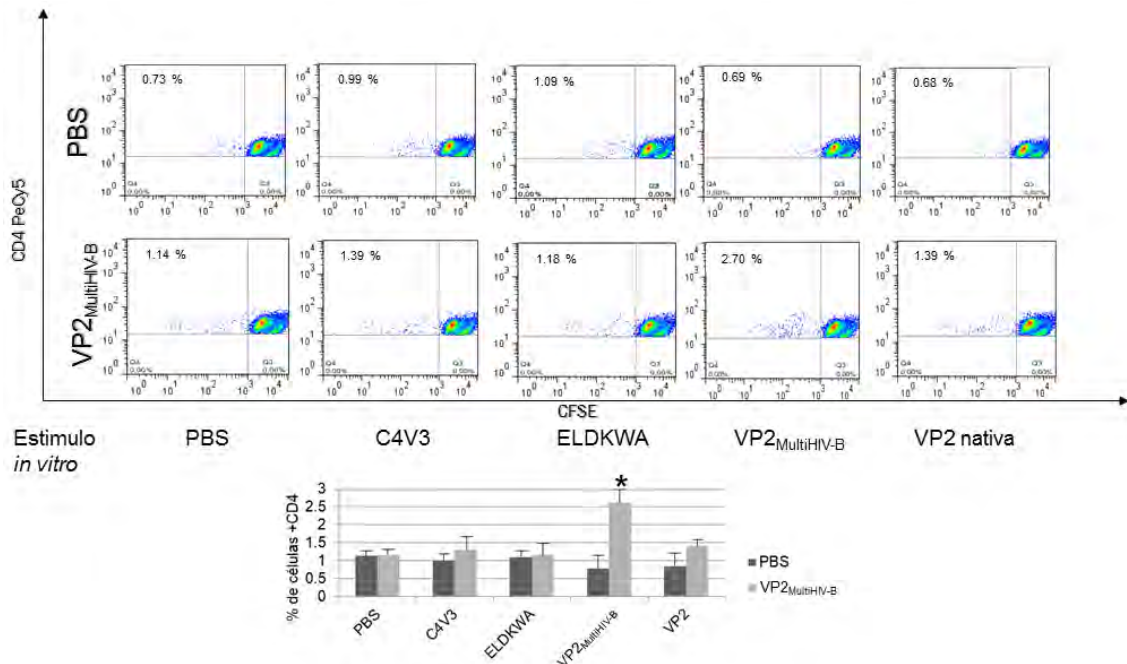


Figura 18. Evaluación de las respuestas proliferativas de células CD4+ de ratones inmunizados con VLPs de VP2_{MultiHIV-B} por vía intranasal. Los ratones recibieron cuatro inmunizaciones de 25 µg de VLPs de VP2_{MultiHIV-B} por vía intranasal y fueron sacrificados 7 días después de la última inmunización. Se obtuvieron células de bazo y fueron marcadas con CFSE, estas se incubaron durante 72 h con los siguientes estímulos: péptidos de VIH (C4V3 y ELDKWA), VLPs de VP2_{MultiHIV-B} y VLPs de VP2 silvestre. En la figura se muestran dot plots representativos de citometría de flujo y graficas de barras con el porcentaje de células en proliferación. * = diferencia significativa p<0.05

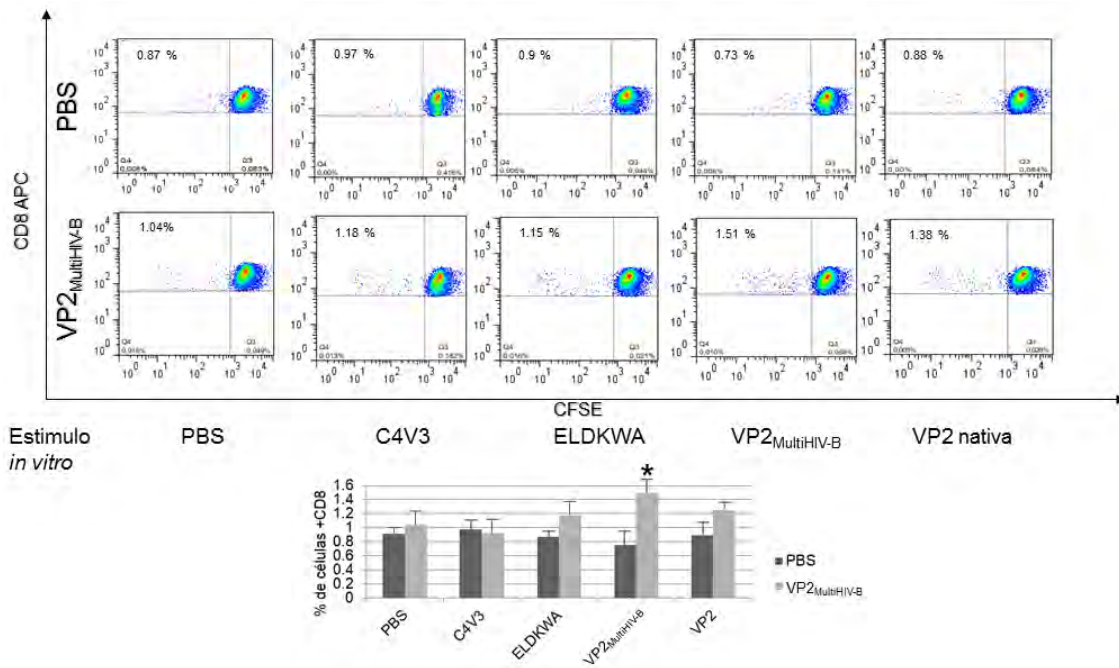


Figura 19. Evaluación de las respuestas proliferativas de células CD8+ de ratones inmunizados con VP2_{MultiHIV-B} por vía intranasal. Los ratones recibieron cuatro inmunizaciones de 25 µg de VLPs de VP2_{MultiHIV-B} por vía intranasal y fueron sacrificados 7 días después de la última inmunización. Se obtuvieron células de bazo y fueron marcadas con CFSE, estas se incubaron durante 72 h con los siguientes estímulos: péptidos de VIH (C4V3 y ELDKWA), VLPs de VP2_{MultiHIV-B} y VLPs de VP2 silvestre. En la figura se muestran dot plots representativos de citometría de flujo y graficas de barras con el porcentaje de células en proliferación. * = diferencia significativa p<0.05

Evaluación de las respuestas humorales tras la inmunización de las VLPs de VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B}

Para evaluar las respuestas humorales generadas por los ratones inmunizados con las VLPs ensambladas de VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B} se midieron los niveles de anticuerpos contra péptidos específicos y contra las VLPs de cada una de las quimeras. Para el caso de las respuestas de anticuerpos generadas por los ratones inmunizados con VLPs de VP2_{MultiHIV-A}, no se observó respuesta de anticuerpos contra los péptidos específicos 4E10, GPGRAF y VD20 (epítomos generadores de anticuerpos ampliamente neutralizantes de la gp41) ni contra las VLPs ensambladas de VP2_{MultiHIV-A}, ya que las lecturas arrojadas por las ELISAS, en las que se evaluó la respuesta de anticuerpos de los isotipos IgG1

e IgG2A no se observó diferencia entre la reactividad de sueros de ratones tratados con el vehículo en comparación con los que fueron inmunizados con las VLPs de VP2_{MultiHIV-A} (figura 20).

Para el caso de las respuestas de anticuerpos generadas por los sueros de ratones inmunizados con las VLPs de VP2_{MultiHIV-B}, tampoco se observó respuesta de anticuerpos IgG1 e IgG2A contra los epítomos específicos b12 y C108G (epítomos correspondientes para anticuerpos ampliamente neutralizantes de la gp120). Sin embargo sí se observó reactividad de anticuerpos del isotipo IgG1 contra las VLPs ensambladas de VP2_{MultiHIV-B}, ya que se indujo un aumento significativo en sueros de ratones inmunizados con estas VLPs en comparación con los que fueron estimulados con el vehículo PBS (figura 21). Debido a que se observó reactividad de anticuerpos en los ratones estimulados con las VLPs VP2_{MultiHIV-B}, pero no con las de VP2_{MultiHIV-A}, se prosiguió con el análisis de los lavados vaginales e intestinales únicamente del grupo inmunizado con las VLPs de VP2_{MultiHIV-B}, donde se evaluó la respuesta de anticuerpos IgG total e IgA. Para el caso de la IgG total, en los lavados intestinales no se observa diferencia en la respuesta de anticuerpos de ratones inmunizados estas VLPs con respecto a los tratados con PBS (figura 21), mientras que en los lavados vaginales se observa un ligero aumento, aunque este cambio no es significativo. En cuanto a la reactividad de anticuerpos IgA, para los lavados intestinales se observó un ligero aumento, sin embargo este no mostró ser significativo, sin embargo para los lavados vaginales sí se observa diferencia significativa en lavados de ratones inmunizados con las VLPs VP2_{MultiHIV-B} con respecto al grupo control (figura 21).

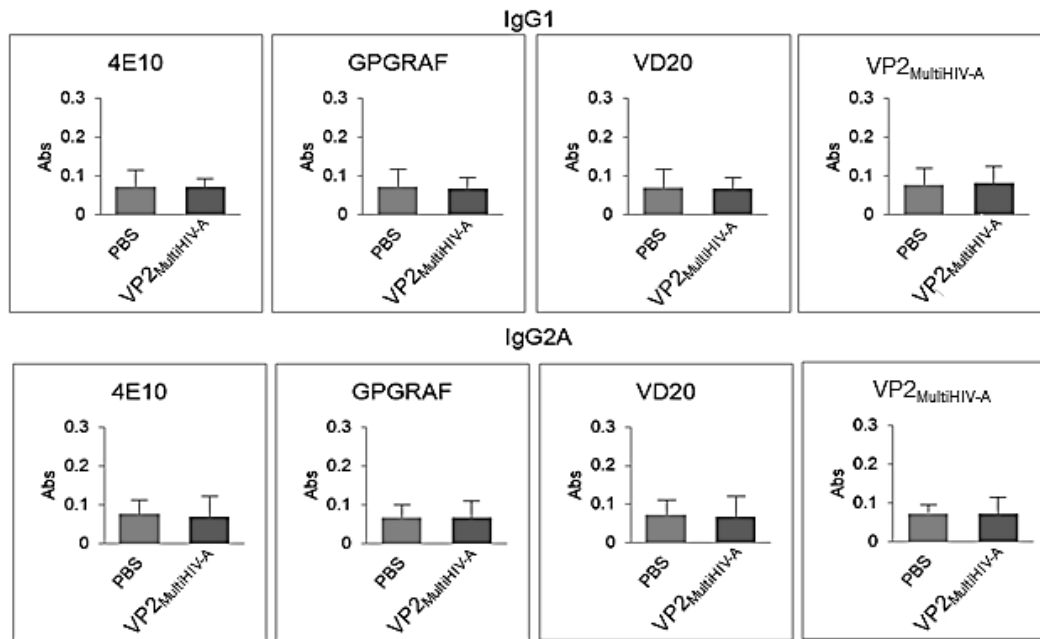


Figura 20. Respuesta inmune de anticuerpos en ratones inmunizados con VP2_{MultiHIV-A}. En panel superior se muestra la respuesta anticuerpos IgG1 generada en ratones inmunizados con 25 μ g de VLPs de VP2_{MultiHIV-A} y con el vehículo PBS contra los péptidos específicos 4E10, GPGRAF y VD20, así como contra la quimera VP2_{MultiHIV-A}. En el panel inferior se muestran los mismos tratamientos indicados en el panel superior, aunque la reactividad de anticuerpos se evaluó para el isotipo IgG2A. El ensayo se llevó a cabo con una dilución 1:100 de sueros de ratones inmunizados con el vehículo PBS más 0.5 M de L-Arginina (PBS) y sueros de ratones inmunizados con VLPs VP2_{MultiHIV-A} (VP2_{MultiHIV-A}). El análisis se llevó a cabo a una DO de 415 nm (n=5, y se analizó por triplicado).

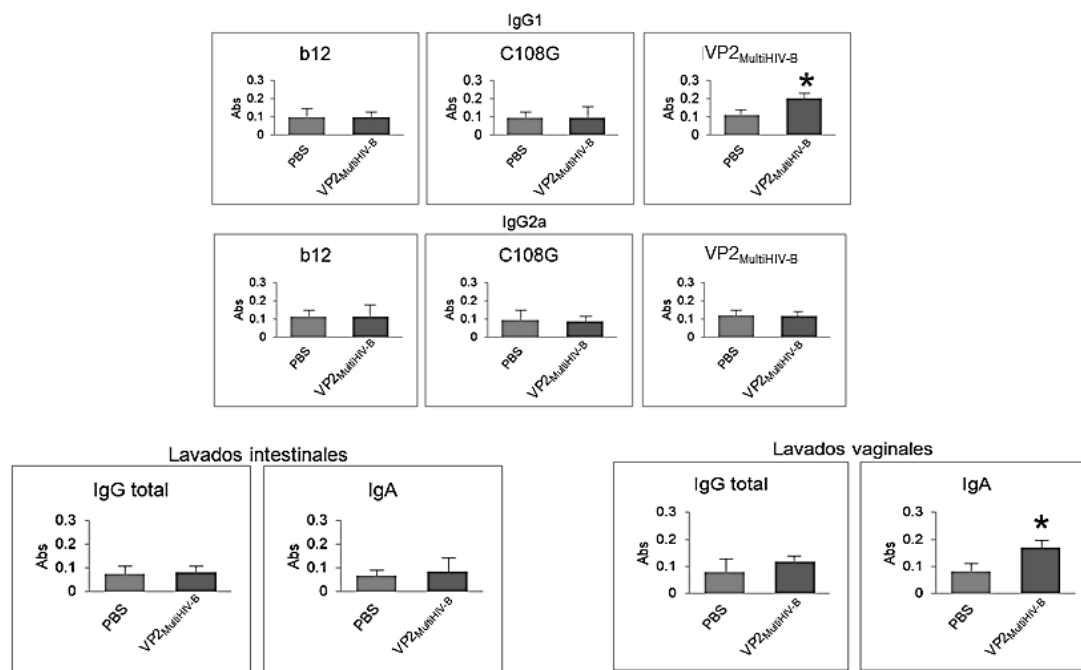


Figura 21. Respuesta inmune de anticuerpos en ratones inmunizados con 25 µg de VLPs de VP2_{MultiHIV-B}. En el primer panel se muestra la respuesta anticuerpos IgG1 contra los péptidos específicos b12 y C108G, así como contra la quimera VP2_{MultiHIV-B}. En el segundo panel se muestran los mismos tratamientos indicados en el primer panel, aunque la reactividad de anticuerpos se evaluó contra el isotipo IgG2A. Para ambos casos el ensayo se llevó a cabo utilizando una dilución 1:100 de sueros de ratones inmunizados con el vehículo PBS más 0.5 M de L-Arginina (PBS) y sueros de ratones inmunizados con VLPs de VP2_{MultiHIV-B} (VP2_{MultiHIV-B}). En el tercer y cuarto paneles se muestra la respuesta de anticuerpos contra los isotipos IgG total e IgA generados por ratones inmunizados con los tratamientos antes mencionados, sin embargo estos fueron evaluados en lavados intestinales y vaginales. Para el caso de los lavados intestinales no se realizaron diluciones, mientras que para los lavados vaginales se realizó una dilución 1:1. Todos los análisis se realizaron a una DO de 415 nm con una n=5 y por triplicado.

DISCUSIÓN

Durante el presente trabajo se estudió el potencial inmunogénico de las VLPs quiméricas multiepitópicas VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B} acoplados a la VP2 del B19V. Estos resultados apoyan el potencial de la proteína VP2 como herramienta biotecnológica, para desplegar péptidos epitópicos vacunales. Destacando la importancia de continuar utilizándola para el diseño de nuevas estrategias para la generación de respuestas inmunológicas, no únicamente contra el HIV, sino que su potencial puede ser ampliado al estudio de otras enfermedades de interés humano.

En su estado nativo, las cápsides del B19V están constituidas de 90-96% de la proteína VP2 y en menor proporción de 4-5% de VP1 (4-5%) (Heegaard & Brown, 2002). Sin embargo, en estudios *in vitro* se ha observado que la VP2, al ser el mayor constituyente del B19V en estado nativo, tiene la propiedad de formar cápsides completas por sí sola (Heegaard & Brown, 2002; Sanchez-Rodriguez et al., 2012). Se sabe que la VP2, además de ser capaz de formar por sí sola VLPs *in vitro*, tiene la peculiaridad de acoplar proteínas en su extremo amino terminal sin afectar la formación de las mismas y hasta el momento se ha reportado que péptidos pequeños y proteínas completas pueden ser acoplados a la VP2 en tamaños que oscilan entre los 58 y los 236 aminoácidos sin observar un efecto adverso. En este trabajo se diseñaron dos proteínas multiepitópicas contra el VIH. Estos epítomos son secuencias que son reconocidas por anticuerpos ampliamente neutralizantes del virus y se fusionaron a la VP2, posteriormente fueron nombradas VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B}. Para ambas construcciones la región multiepitópica anclada a la VP2 no sobrepasó los 236 aminoácidos ya reportados. Para el caso de la quimera VP2_{MultiHIV-A} el tamaño fue de 167 aminoácidos, mientras que para la quimera VP2_{MultiHIV-B} se incluyeron 195 aminoácidos, por lo cual el tamaño de estos péptidos no debería interferir con la formación de VLPs. En cuanto a los péptidos multiepitópicos de VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B}, la elección de los epítomos se basó en la propuesta de péptido multiepitópico expresado en plantas de tabaco de Rubio Infante y colaboradores del 2015 (Rubio-Infante et al., 2015). Esta construcción incluye varios epítomos lineales y conservados de

la envoltura viral de la gp120 y la gp41. Particularmente la región denominada C4V3 presente en esta construcción fue incluida tanto en VP2_{MultiHIV-A} como en VP2_{MultiHIV-B} (figuras 5 y 6), debido a que en estudios previos se demostró que es un péptido inmunogénico capaz de inducir respuestas significativas tanto humorales como celulares dirigidas hacia esta región (Govea-Alonso et al., 2013; Rubio-Infante et al., 2015; Varona-Santos et al., 2006). Además, la región C4V3 es antigénica ya que es reconocida por muestras de sueros de pacientes positivos para el virus (Rubio-Infante et al., 2015). La secuencia de VP2_{MultiHIV-A}, además de incluir esta secuencia, se diseñó de tal forma que incluyera epítopos que son reconocidos por anticuerpos ampliamente neutralizantes dirigidos contra la región externa próxima a la membrana (MPER) de la gp41 como 4E10, VD20 y ELDKWA (figura 5), ya que como se ha reportado, este sitio es un blanco importante para la neutralización de hasta el 50% de los aislados primarios del VIH que se han evaluado (González et al., 2018; Liu, Deng, Dey, Moore, & Lu, 2009; Lutje Hulsik et al., 2013; Penn-Nicholson et al., 2008; Shen et al., 2010). Para el caso de la construcción VP2_{MultiHIV-B}, además de la secuencia C4V3, se incluyeron epítopos reconocidos por anticuerpos neutralizantes dirigidos contra la gp120, como GPGRAF, C108g, b12 y el epítipo correspondiente al sitio de reconocimiento del receptor CD4 (figura 6). Estos epítopos son de interés ya que se ha descrito que los anticuerpos dirigidos hacia estos sitios son capaces de neutralizar hasta el 60% de los aislados primarios del virus, debido a que se encuentran sitios que dan estabilidad al trímero formado por la gp120 (Mascola & Haynes, 2013; Moody et al., 2015; Parren et al., 1998; Spenlehauer et al., 1998; Wu et al., 1995; York et al., 2001).

Los reportes actuales en los que usan el enfoque multiepitópico para tratar de generar respuestas inmunológicas contra el VIH están basados en vacunas de ADN que contienen secuencias de epítopos correspondientes a proteínas de la envoltura (gp120 principalmente), así como secuencias de epítopos de Pol y Gag, sin embargo no se ha observado una respuesta protectora favorable que apoye el uso de estos epítopos (Y. Lu, Ding, & Chen, 2001; Paul & Piontkivska, 2009; Rosa et al., 2015). Por lo cual el enfoque multiepitópico a partir de epítopos de la gp120 y la gp41 reconocidos por anticuerpos ampliamente neutralizantes es una estrategia que no ha sido del todo explorada, por lo cual

podría ser una opción viable para proveer de inmunidad protectora. Este posible efecto se busca ser potenciado con el uso de un acarreador de proteínas como las VLPs, en particular la VP2 del B19V, que ha mostrado ser una buena herramienta para el desarrollo de vacunas.

Tanto la VP2 silvestre, como las quimeras VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B} con las que se llevó a cabo este estudio son proteínas que se expresaron de manera recombinante en *E. coli*, y debido a que las tres proteínas comparten la región de VP2, para su caracterización a nivel de proteína se usó un anticuerpo Anti-VP2 policlonal hecho en conejo, con lo cual se confirmó de manera parcial la identidad de ambas quimeras, ya que el peso observado en los “Western blots” de las figuras 12 y 13 concuerda con el peso teórico calculado. Posteriormente la identidad de ambas construcciones se confirmó mediante secuenciación a nivel de nucleótido, sin embargo queda aún por afinar esta caracterización a un nivel más específico, lo cual podría hacerse de igual manera mediante “Western blot” utilizando un anticuerpo específico dirigido contra la región multiepitópica de cada construcción.

Una vez corroborada la identidad de cada una de las quimeras de VP2 se prosiguió con el ensamblaje de la VP2 con la intención de formar VLPs de ambas construcciones quiméricas de VP2 *in vitro*. Sin embargo como lo menciona Sanchez-Rodriguez “es un proceso complejo” debido a que diversos factores pueden afectar la formación de las VLPs. En este trabajo, el ensamblaje se realizó bajo las condiciones ya reportadas para la VP2 silvestre (Sanchez-Rodriguez et al., 2012), prestando particular atención a la temperatura (tanto de ensamblaje como de almacenamiento), concentración de sales (a las que no se observaron efectos adversos en las interacciones iónicas de la VP2) y pH, que para el caso de este trabajo era de suma importancia tenerlo en condiciones fisiológicas para la inmunización de organismos vivos. Además de lo ya mencionado se añadió como chaperona química la L-Arginina, debido a que se ha reportado que este aminoácido favorece el ensamblaje y la estabilidad de las VLPs de VP2 (Cayetano-Cruz, Coffeen, Valadez-Garcia, Montiel, & Bustos-Jaimes, 2018). Para el caso de la VP2 ensamblada en este trabajo se observó que la mayor parte de la población

analizada por volumen estaba en un rango de tamaño entre 22-32 nm, teniendo el mayor porcentaje de la población en un tamaño de 27 nm (figura 15a) lo cual concuerda con lo ya reportado para estas VLPs. Para la quimera VP2_{MultiHIV-A}, que fue ensamblada en proporción 1:1 con la VP2 nativa, el tamaño promedio fue 24.2 ± 6.9 nm (figura 15b), mientras que para la quimera VP2_{MultiHIV-B}, el mayor porcentaje de la población estuvo en 31 ± 5.8 nm (figura 15c). Aunque se observa una diferencia en el tamaño de la población de ambas quimeras con respecto a la VP2, ambas se encuentran dentro del rango ya reportado para la proteína silvestre, lo cual concuerda con lo que se ha observado para otras quimeras de VP2 que tienen fusionados péptidos y proteínas completas, tal es el caso de la proteína Verde Fluorescente “superfolder” y péptidos derivados de la glicoproteína de fusión del Virus Sincitial Respiratorio (RSV) cuyos tamaños promedio están también dentro del rango (Bustos-Jaimes, Soto-Roman, Gutierrez-Landa, Valadez-Garcia, & Segovia-Trinidad, 2017; Cayetano-Cruz et al., 2018; Del Carmen Moran-Garcia et al., 2016). Sin embargo cabe recalcar que estas proteínas antes mencionadas fueron ensambladas usando VP2 silvestre como proteína accesoria para favorecer la estabilidad de las VLPs como en el caso de la quimera VP2_{MultiHIV-A}. De manera interesante, para el caso de la quimera VP2_{MultiHIV-B}, esta fue ensamblada con el 100% de esta proteína sin la necesidad de usar la VP2 nativa como proteína accesoria, lo cual hasta este momento no había sido reportado para una proteína de no más de 64 aminoácidos (observado para la proteína F del Virus Sincitial Respiratorio) (Del Carmen Moran-Garcia et al., 2016). Los resultados observados en este trabajo, aunados a lo observado en otros estudios apoyan la hipótesis de que la VP2 es un buen sistema de andamiaje de proteínas.

La VLP VP2 del Parvovirus humano B19 (B19V) ha mostrado ser una buena herramienta biotecnológica para acarrear péptidos, y tomando en cuenta otras características importantes como “inmunogenicidad intrínseca” ya que por su naturaleza viral puede favorecer el procesamiento y presentación por parte de las células presentadoras de antígeno. En este trabajo se evaluó el potencial inmunogénico de las quimeras VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B} acopladas a la VP2 del B19V y es pertinente mencionar que para evaluar la inmunogenicidad de cada quimera se llevaron a cabo experimentos independientes incluyendo

grupos controles negativos adecuados. Las diferencias en inmunogenicidad entre ambas proteínas podrían explicarse por diferentes posibilidades, por ejemplo, en el caso de la quimera VP2_{MultiHIV-A}, que la concentración de péptido multiepitópico sea insuficiente por estar conformada de proteína silvestre y quimérica (proporción 1:1), otra explicación podría ser que no se estén desplegando de forma adecuada los epítomos en la VLP para lo cual sería necesario primero determinar que se estén desplegando hacia la superficie de la VLP, y en el caso de que esta posibilidad no fuera favorable modificar el diseño de esta construcción modificando el orden de acomodo de epítomos o agregar los epítomos individuales para ser expuestos por una sola VLP. Otra posibilidad de enfoque sería el modificar el tipo de linkers para espaciar los epítomos desplegados, en este estudio se usaron linkers flexibles que consisten los aminoácidos Glicina y Alanina, pero podría modificarse usando linkers rígidos, así como clonar los epítomos de manera individual.

En reportes anteriores donde se trabajó con la proteína Multi-HIV expresada en plantas de tabaco (base para el diseño de las quimeras de VP2, VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B}), se había observado que la inmunización oral con plantas de tabaco indujo respuestas celulares significativas en células de bazo. Se observó que los tras el re estímulo tanto con esta proteína Multi-HIV, como con los péptidos individuales C4V3 y ELDKWA, incluidos en esta construcción se generaban respuestas proliferativas celulares significativas (Rubio-Infante et al., 2015). En contraste, en este trabajo se observó un aumento significativo en la proliferación de células CD4 y CD8, únicamente tras el re estímulo con las VLPs de VP2_{MultiHIV-B}. Las VLPs de VP2_{MultiHIV-A}, mostraron un ligero aumento con respecto al grupo control, aunque esta diferencia no fue significativa. Esta diferencia en inmunogenicidad entre ambas quimeras de VP2 puede atribuirse, entre otras cosas, a la concentración de la región multiepitópica administrada, ya que recordando, las VLPs de VP2_{MultiHIV-A} se ensamblaron en proporción 1:1 con la VP2 nativa, lo que en concentración equivale aproximadamente a 6.25 µg de región multiepitópica, la mitad de lo administrado de VLPs de VP2_{MultiHIV-B} ensamblada al 100%, cuya concentración se calcula en aproximadamente 12.5 µg. En cuanto a la falta de respuesta proliferativa específica hacia los péptidos C4V3 y ELDKWA tras la inmunización con ambas quimeras, puede deberse a

problemas técnicos por el uso de péptidos de tamaño inadecuado y al diseño de los péptidos utilizados. Ya que en el estudio mencionado en el que se evaluó la inmunogenicidad de la Multi-HIV, el ensayo de proliferación se realizó utilizando péptidos de mayor tamaño, mientras que en el presente estudio se utilizaron péptidos de menos de 8 aminoácidos, lo que pudo haber provocado que no se pudieran presentar de forma adecuada.

En cuanto a la evaluación de la inmunogenicidad de la proteína C4V3 recombinante, Rubio-Infante y colaboradores reportaron que esta era capaz de generar respuestas celulares de linfocitos CD4 y CD8 al ser re estimulados con este péptido, sin embargo se utilizó un péptido constituido por seis repeticiones de este epítipo, el cual se denominó C4V3(6) (Govea-Alonso et al., 2013). En contraste, en el presente trabajo para evaluar la respuesta celular hacia C4V3 en ratones inmunizados con VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B}, se re estimuló con una mezcla de los péptidos individuales de C4 y V3 de tamaño pequeño, por lo que la falta de respuesta puede atribuirse a esta modificación metodológica, por lo que es necesario continuar la evaluación de la inmunogenicidad de VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B}, realizando el análisis individual de los epítopos incluidos en las construcciones usando péptidos de tamaño apropiado (de 10 aa) (Govea-Alonso et al., 2013; Rubio-Infante et al., 2015).

En cuanto a la evaluación de la respuesta hacia el péptido ELDKWA, el tamaño también pudo haber sido el factor que contribuyó a no observar respuesta hacia este péptido, debido a que está constituido por únicamente seis aminoácidos, y es bien sabido que para ser cargados dentro del surco de unión al péptido del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC-I y MHC-II) se requiere un mínimo de 8 aa por lo que usualmente se usan péptidos de 10 aminoácidos para asociarse al surco de unión al péptido. Debido a lo ya mencionado, queda por evaluar si bajo un régimen de péptidos adecuado como los utilizados por Rubio-Infante y colaboradores, las VLPs quiméricas VP2_{MultiHIV-A} y VP2_{MultiHIV-B} pueden generar proliferación de linfocitos.

En cuanto a las respuestas humorales, para el caso de la quimera VP2_{MultiHIV-A} no se observó respuesta de anticuerpos hacia péptidos específicos de la gp41 ni contra las VLPs de VP2_{MultiHIV-A} a nivel sistémico. Por lo cual se decidió no

analizar la respuesta de anticuerpos en otros sitios específicos. Las posibles causas de estos resultados negativos pudieran deberse a que la dosis de antígeno haya sido insuficiente y se requiera evaluar otro esquema y dosis de inmunización. Otra posibilidad es que se requieran péptidos de mayor tamaño para el ensayo de detección de la respuesta de anticuerpos por ELISA. Aunque otra causa para explicar la ausencia de respuesta de anticuerpos hacia los epítomos de HIV es que no se desplieguen de forma adecuada en la superficie de las VLPs, por lo tanto es necesario completar la caracterización de la inmunogenicidad y despliegue de péptidos de estas VLPs antes de recurrir a rediseñar el orden del despliegue de los epítomos que contiene esta proteína VP2 quimérica.

Para el caso de la quimera VP2_{MultiHIV-B} si se lograron inducir respuestas en suero del isotipo IgG1 hacia las VLPs completas, aunque no se observó respuesta de anticuerpos contra péptidos específicos de la gp120. En estos grupos se llevó a cabo el análisis de la respuesta de anticuerpos a nivel de intestino y vagina, sitios de suma importancia en la infección por VIH. Se observó que tras la inmunización con VLPs de VP2_{MultiHIV-B}, hubo un aumento en la reactividad de anticuerpos IgA hacia VLPs de esta quimera en lavados vaginales, sin embargo en intestino no se observó respuesta.

Además de las posibilidades discutidas anteriormente, para el caso de la VP2_{MultiHIV-A}, otra razón por la que podrían no observarse respuestas hacia ninguno de los péptidos específicos podría deberse a que en ambas quimeras una vez ensambladas se generan anticuerpos hacia la conformación tridimensional que adoptan, la cual difiere de la mostrada por los péptidos lineales, por lo que no pueden ser reconocidos de manera individual. Por lo cual no se descarta que los anticuerpos generados por los ratones inmunizados con ambas quimeras puedan reconocer proteínas nativas del VIH.

CONCLUSIONES

- I. Se diseñaron dos construcciones multiepitópicas con epítomos identificados como sitio de reconocimiento de anticuerpos neutralizantes contra el VIH acopladas a la VP2 del Parvovirus humano B19
- II. Se lograron clonar, expresar y purificar dos proteínas quiméricas VP2 multiepitópicas: VP2_{MultiHIV-A}, VP2_{MultiHIV-B}. La correspondencia de ambas construcciones fue verificada por “Western blot”, confirmando que el peso teórico corresponde con el observado
- III. La quimera multiepitópica VP2_{MultiHIV-A} necesitó de la VP2 nativa como proteína accesoria para formar VLPs estables (en proporción 1:1)
- IV. La quimera multiepitópica VP2_{MultiHIV-B} acoplada a la VP2 fue capaz de ensamblarse sin la necesidad de usar la VP2 nativa para estabilizar las VLPs
- V. Las VLPs formadas por la quimera multiepitópica VP2_{MultiHIV-A} no mostraron ser inmunogénicas, ya que solo indujeron un ligero aumento en la proliferación de células CD4 y CD8 en ratones inmunizados con estas VLPs, sin embargo este no fue significativo
- VI. Las VLPs formadas por la quimera multiepitópica VP2_{MultiHIV-B}, mostraron ser inmunogénicas al provocar un aumento significativo en la proliferación de células CD4 y CD8 en ratones inmunizados con estas VLPs, además inducir respuestas de anticuerpos IgG1 a nivel sistémico e IgA a nivel de la mucosa vaginal de estos ratones

LITERATURA CITADA

- Archin, N. M., Sung, J. M., Garrido, C., Soriano-Sarabia, N., & Margolis, D. M. (2014). Eradicating HIV-1 infection: seeking to clear a persistent pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 12, 750. doi: 10.1038/nrmicro3352
- Barouch, D. H. (2008). Challenges in the Development of an HIV-1 Vaccine. *Nature*, 455(7213), 613-619. doi: 10.1038/nature07352
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., . . . Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599), 868-871.
- Brechtl, J. R., Breitbart, W., Galletta, M., Krivo, S., & Rosenfeld, B. (2001). The use of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with advanced HIV infection: impact on medical, palliative care, and quality of life outcomes. *J Pain Symptom Manage*, 21(1), 41-51.
- Broliden, P. A., von Gegerfelt, A., Clapham, P., Rosen, J., Fenyő, E. M., Wahren, B., & Broliden, K. (1992). Identification of human neutralization-inducing regions of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(2), 461-465. doi: 10.1073/pnas.89.2.461
- Bustos-Jaimes, I., Soto-Roman, R. A., Gutierrez-Landa, I. A., Valadez-Garcia, J., & Segovia-Trinidad, C. L. (2017). Construction of protein-functionalized virus-like particles of parvovirus B19. *J Biotechnol*, 263, 55-63. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.09.014
- Campbell, E. M., & Hope, T. J. (2015). HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. *Nature Reviews Microbiology*, 13, 471. doi: 10.1038/nrmicro3503
- Cayetano-Cruz, M., Coffeen, C. F., Valadez-Garcia, J., Montiel, C., & Bustos-Jaimes, I. (2018). Decoration of virus-like particles with an enzymatic activity of biomedical interest. *Virus Res*, 255, 1-9. doi: 10.1016/j.virusres.2018.06.014
- Coombs, R. W. (2010). 14 - Human Immunodeficiency Virus Infection and the Acquired Immunodeficiency Syndrome: Viral Pathogenesis, Laboratory Diagnosis and Monitoring. In S. A. Morse, R. C. Ballard, K. K. Holmes & A. A. Moreland (Eds.), *Atlas of Sexually Transmitted Diseases and AIDS (Fourth Edition)* (pp. 240-255). London: W.B. Saunders.
- Cortez, V., Wang, B., Dingens, A., Chen, M. M., Ronen, K., Georgiev, I. S., . . . Overbaugh, J. (2015). The Broad Neutralizing Antibody Responses after HIV-1 Superinfection Are Not Dominated by Antibodies Directed to Epitopes Common in Single Infection. *PLoS pathogens*, 11(7), e1004973. doi: 10.1371/journal.ppat.1004973
- Chermann, J. C., Barre-Sinoussi, F., Dauguet, C., Brun-Vezinet, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., & Montagnier, L. (1983). Isolation of a new retrovirus in a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome. *Antibiot Chemother (1971)*, 32, 48-53.

- Churchill, M. J., Deeks, S. G., Margolis, D. M., Siliciano, R. F., & Swanstrom, R. (2015). HIV reservoirs: what, where and how to target them. *Nature Reviews Microbiology*, *14*, 55. doi: 10.1038/nrmicro.2015.5
- Deeks, S. G., Overbaugh, J., Phillips, A., & Buchbinder, S. (2015). HIV infection. *Nature Reviews Disease Primers*, *1*, 15035. doi: 10.1038/nrdp.2015.35
- Del Carmen Moran-Garcia, A., Rivera-Toledo, E., Echeverria, O., Vazquez-Nin, G., Gomez, B., & Bustos-Jaimes, I. (2016). Peptide presentation on primate erythroparvovirus 1 virus-like particles: In vitro assembly, stability and immunological properties. *Virus Res*, *224*, 12-18. doi: 10.1016/j.virusres.2016.08.007
- Ensoli, B., Cafaro, A., Monini, P., Marcotullio, S., & Ensoli, F. (2014). Challenges in HIV Vaccine Research for Treatment and Prevention. *Frontiers in Immunology*, *5*, 417. doi: 10.3389/fimmu.2014.00417
- Freed, E. O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nature Reviews Microbiology*, *13*, 484. doi: 10.1038/nrmicro3490
- German Advisory Committee Blood, S. A. o. P. T. b. B. (2016). Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, *43*(3), 203-222. doi: 10.1159/000445852
- Gilbert, L., Toivola, J., Vällilehto, O., Saloniemä, T., Cunningham, C., White, D., . . . Oker-Blom, C. (2006). Truncated forms of viral VP2 proteins fused to EGFP assemble into fluorescent parvovirus-like particles. *Journal of nanobiotechnology*, *4*, 13-13. doi: 10.1186/1477-3155-4-13
- González, N., McKee, K., Lynch, R. M., Georgiev, I. S., Jimenez, L., Grau, E., . . . Alcamí, J. (2018). Characterization of broadly neutralizing antibody responses to HIV-1 in a cohort of long term non-progressors. *PloS one*, *13*(3), e0193773-e0193773. doi: 10.1371/journal.pone.0193773
- Govea-Alonso, D. O., Rubio-Infante, N., Garcia-Hernandez, A. L., Varona-Santos, J. T., Korban, S. S., Moreno-Fierros, L., & Rosales-Mendoza, S. (2013). Immunogenic properties of a lettuce-derived C4(V3)6 multiepitopic HIV protein. *Planta*, *238*(4), 785-792. doi: 10.1007/s00425-013-1932-y
- Haynes, B. F., Ma, B., Montefiori, D. C., Wrin, T., Petropoulos, C. J., Sutherland, L. L., . . . Liao, H.-X. (2006). Analysis of HIV-1 subtype B third variable region peptide motifs for induction of neutralizing antibodies against HIV-1 primary isolates. *Virology*, *345*(1), 44-55. doi: https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.08.042
- Heegaard, E. D., & Brown, K. E. (2002). Human Parvovirus B19. *Clinical Microbiology Reviews*, *15*(3), 485-505. doi: 10.1128/cmr.15.3.485-505.2002
- Kaplan, J. E., Benson, C., Holmes, K. K., Brooks, J. T., Pau, A., & Masur, H. (2009). Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. *MMWR Recomm Rep*, *58*(Rr-4), 1-207; quiz CE201-204.
- Kaplan, J. E., Hu, D. J., Holmes, K. K., Jaffe, H. W., Masur, H., & De Cock, K. M. (1996). Preventing opportunistic infections in human immunodeficiency virus-infected persons: implications for the developing world. *Am J Trop Med Hyg*, *55*(1), 1-11.

- Karasavvas, N., Billings, E., Rao, M., Williams, C., Zolla-Pazner, S., Bailer, R. T., . . . de Souza, M. S. (2012). The Thai Phase III HIV Type 1 Vaccine trial (RV144) regimen induces antibodies that target conserved regions within the V2 loop of gp120. *AIDS Res Hum Retroviruses*, *28*(11), 1444-1457. doi: 10.1089/aid.2012.0103
- Karasavvas, N., Billings, E., Rao, M., Williams, C., Zolla-Pazner, S., Bailer, R. T., . . . Collaboration, M. T. (2012). The Thai Phase III HIV Type 1 Vaccine trial (RV144) regimen induces antibodies that target conserved regions within the V2 loop of gp120. *AIDS Res Hum Retroviruses*, *28*(11), 1444-1457. doi: 10.1089/aid.2012.0103
- Kelker, H. C., Itri, V. R., & Valentine, F. T. (2010). A Strategy for Eliciting Antibodies against Cryptic, Conserved, Conformationally Dependent Epitopes of HIV Envelope Glycoprotein. *PloS one*, *5*(1), e8555. doi: 10.1371/journal.pone.0008555
- Kerina, D., Babill, S.-P., & Muller, F. (2013). HIV Diversity and Classification, Role in Transmission. *Advances in Infectious Diseases, Vol.03No.02*, 11. doi: 10.4236/aid.2013.32022
- Korbie, D. J., & Mattick, J. S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc*, *3*(9), 1452-1456. doi: 10.1038/nprot.2008.133
- Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J., & Hendrickson, W. A. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*, *393*, 648. doi: 10.1038/31405
- Laskey, S. B., Pohlmeier, C. W., Bruner, K. M., & Siliciano, R. F. (2016). Evaluating Clonal Expansion of HIV-Infected Cells: Optimization of PCR Strategies to Predict Clonality. *PLoS pathogens*, *12*(8), e1005689-e1005689. doi: 10.1371/journal.ppat.1005689
- Laskey, S. B., & Siliciano, R. F. (2014). A mechanistic theory to explain the efficacy of antiretroviral therapy. *Nature Reviews Microbiology*, *12*, 772. doi: 10.1038/nrmicro3351
- Lederman, M. M., Penn-Nicholson, A., Cho, M., & Mosier, D. (2006). Biology of CCR5 and its role in HIV infection and treatment. *Jama*, *296*(7), 815-826. doi: 10.1001/jama.296.7.815
- Liu, J., Deng, Y., Dey, A. K., Moore, J. P., & Lu, M. (2009). Structure of the HIV-1 gp41 membrane-proximal ectodomain region in a putative prefusion conformation. *Biochemistry*, *48*(13), 2915-2923. doi: 10.1021/bi802303b
- Lu, D. Y., Wu, H. Y., Yarla, N. S., Xu, B., Ding, J., & Lu, T. R. (2018). HAART in HIV/AIDS Treatments: Future Trends. *Infect Disord Drug Targets*, *18*(1), 15-22. doi: 10.2174/1871526517666170505122800
- Lu, Y., Ding, J., & Chen, Y. H. (2001). Immunogenicity and specificity of the candidate multi-epitope-vaccines against HIV-1. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, *23*(4), 487-494. doi: 10.1081/iph-100108595
- Lua, L. H., Connors, N. K., Sainsbury, F., Chuan, Y. P., Wibowo, N., & Middelberg, A. P. (2014). Bioengineering virus-like particles as vaccines. *Biotechnol Bioeng*, *111*(3), 425-440. doi: 10.1002/bit.25159
- Lutje Hulsik, D., Liu, Y. Y., Strokappe, N. M., Battella, S., El Khattabi, M., McCoy, L. E., . . . Rutten, L. (2013). A gp41 MPER-specific llama VHH requires a hydrophobic CDR3 for neutralization but not for antigen

- recognition. *PLoS Pathog*, 9(3), e1003202. doi: 10.1371/journal.ppat.1003202
- Maartens, G., Celum, C., & Lewin, S. R. (2014). HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *The Lancet*, 384(9939), 258-271. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60164-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60164-1)
- Mascola, J. R., & Haynes, B. F. (2013). HIV-1 neutralizing antibodies: understanding nature's pathways. *Immunological reviews*, 254(1), 225-244. doi: 10.1111/imr.12075
- McMichael, A. J. (2006). HIV vaccines. *Annu Rev Immunol*, 24, 227-255. doi: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090605
- Moody, M. A., Gao, F., Gurley, T. C., Amos, J. D., Kumar, A., Hora, B., . . . Haynes, B. F. (2015). Strain-Specific V3 and CD4 Binding Site Autologous HIV-1 Neutralizing Antibodies Select Neutralization-Resistant Viruses. *Cell host & microbe*, 18(3), 354-362. doi: 10.1016/j.chom.2015.08.006
- Parren, P. W., Mondor, I., Nanche, D., Ditzel, H. J., Klasse, P. J., Burton, D. R., & Sattentau, Q. J. (1998). Neutralization of human immunodeficiency virus type 1 by antibody to gp120 is determined primarily by occupancy of sites on the virion irrespective of epitope specificity. *Journal of Virology*, 72(5), 3512-3519.
- Paul, S., & Piontkivska, H. (2009). Discovery of novel targets for multi-epitope vaccines: Screening of HIV-1 genomes using association rule mining. *Retrovirology*, 6(1), 62. doi: 10.1186/1742-4690-6-62
- Penn-Nicholson, A., Han, D. P., Kim, S. J., Park, H., Ansari, R., Montefiori, D. C., & Cho, M. W. (2008). Assessment of antibody responses against gp41 in HIV-1-infected patients using soluble gp41 fusion proteins and peptides derived from M group consensus envelope. *Virology*, 372(2), 442-456. doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.11.009>
- Plotkin, S. A. (2010). The RV144 Thai HIV vaccine trial. *Hum Vaccin*, 6(2), 159.
- Pollara, J., Easterhoff, D., & Fouda, G. G. (2017). Lessons learned from human HIV vaccine trials. *Current opinion in HIV and AIDS*, 12(3), 216-221. doi: 10.1097/COH.0000000000000362
- Popovic, M., Sarngadharan, M. G., Read, E., & Gallo, R. C. (1984). Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science*, 224(4648), 497-500.
- Reeves, J. D., & Doms, R. W. (2002). Human immunodeficiency virus type 2. *J Gen Virol*, 83(Pt 6), 1253-1265. doi: 10.1099/0022-1317-83-6-1253
- Roldao, A., Mellado, M. C., Castilho, L. R., Carrondo, M. J., & Alves, P. M. (2010). Virus-like particles in vaccine development. *Expert Rev Vaccines*, 9(10), 1149-1176. doi: 10.1586/erv.10.115
- Rosa, D. S., Ribeiro, S. P., Fonseca, S. G., Almeida, R. R., Santana, V. C., Apostólico, J. d. S., . . . Cunha-Neto, E. (2015). Multiple Approaches for Increasing the Immunogenicity of an Epitope-Based Anti-HIV Vaccine. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 31(11), 1077-1088. doi: 10.1089/aid.2015.0101
- Rubio-Infante, N., Govea-Alonso, D. O., Romero-Maldonado, A., Garcia-Hernandez, A. L., Ilhuicatzí-Alvarado, D., Salazar-Gonzalez, J. A., . . . Moreno-Fierros, L. (2015). A Plant-Derived Multi-HIV Antigen Induces Broad Immune Responses in Orally Immunized Mice. *Mol Biotechnol*, 57(7), 662-674. doi: 10.1007/s12033-015-9856-3

- Sanchez-Rodriguez, S. P., Munch-Anguiano, L., Echeverria, O., Vazquez-Nin, G., Mora-Pale, M., Dordick, J. S., & Bustos-Jaimes, I. (2012). Human parvovirus B19 virus-like particles: In vitro assembly and stability. *Biochimie*, *94*(3), 870-878. doi: 10.1016/j.biochi.2011.12.006
- Sanjuán, R., Nebot, M. R., Chirico, N., Mansky, L. M., & Belshaw, R. (2010). Viral Mutation Rates. *Journal of Virology*, *84*(19), 9733-9748. doi: 10.1128/jvi.00694-10
- Shen, X., Dennison, S. M., Liu, P., Gao, F., Jaeger, F., Montefiori, D. C., . . . Tomaras, G. D. (2010). Prolonged exposure of the HIV-1 gp41 membrane proximal region with L669S substitution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(13), 5972-5977. doi: 10.1073/pnas.0912381107
- Spencehauer, C., Saragosti, S., Fleury, H. J. A., Kirn, A., Aubertin, A.-M., & Moog, C. (1998). Study of the V3 Loop as a Target Epitope for Antibodies Involved in the Neutralization of Primary Isolates versus T-Cell-Line-Adapted Strains of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Virology*, *72*(12), 9855-9864.
- Taylor, B. S., Sobieszczyk, M. E., McCutchan, F. E., & Hammer, S. M. (2008). The Challenge of HIV-1 Subtype Diversity. *The New England journal of medicine*, *358*(15), 1590-1602. doi: 10.1056/NEJMra0706737
- Vanini, S., Longhi, R., Lazzarin, A., Vigo, E., Siccardi, A. G., & Viale, G. (1993). Discrete regions of HIV-1 gp41 defined by syncytia-inhibiting affinity-purified human antibodies. *AIDS*, *7*(2), 167-174.
- Varona-Santos, J. T., Vazquez-Padron, R. I., & Moreno-Fierros, L. (2006). Production of a short recombinant C4V3 HIV-1 immunogen that induces strong anti-HIV responses by systemic and mucosal routes without the need of adjuvants. *Viral Immunol*, *19*(2), 237-249. doi: 10.1089/vim.2006.19.237
- Weiner, D. B. (2010). RV144: old vs. new. *Hum Vaccin*, *6*(2), 159-161.
- Wu, Z., Kayman, S. C., Honnen, W., Revesz, K., Chen, H., Vijn-Warrier, S., . . . Pinter, A. (1995). Characterization of neutralization epitopes in the V2 region of human immunodeficiency virus type 1 gp120: role of glycosylation in the correct folding of the V1/V2 domain. *Journal of Virology*, *69*(4), 2271-2278.
- York, J., Follis, K. E., Trahey, M., Nyambi, P. N., Zolla-Pazner, S., & Nunberg, J. H. (2001). Antibody binding and neutralization of primary and T-cell line-adapted isolates of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*, *75*(6), 2741-2752. doi: 10.1128/JVI.75.6.2741-2752.2001

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

```

* * * * *
MA-E GGAGATATACATATGGGCTGGTAAAAACAGATCATTAACATGTGGCAAGAAGTAGGCAAAGCTATGTATGCCCTGCTGGCTCGTCCGAACAACAACACCC 100
| | | | |
MA-S GGAGATATACATATGGGCTGGTAAAAACAGATCATTAACATGTGGCAAGAAGTAGGCAAAGCTATGTATGCCCTGCTGGCTCGTCCGAACAACAACACCC 100
* * * * *

* * * * *
MA-E GTAAGTCCATTACATCCGGTCCAGGCCGTGCCTTCTATGCAACCGAGGCTGGTGCAGCTGGTTTGACATCACCAACTGGCTGTGAAGAAGAAGAAAGG 200
| | | | |
MA-S GTAAGTCCATTACATCCGGTCCAGGCCGTGCCTTCTATGCAACCGAGGCTGGTGCAGCTGGTTTGACATCACCAACTGGCTGTGAAGAAGAAGAAAGG 200
* * * * *

* * * * *
MA-E TGCGGGTGCAAACCTGGTTCGACATCTCTAATTGGCTGTGGTATATCAAAGGCCGAGGTGGTATCAAACAGCTGCAAGCACGCGTGGCAGTAGAACCG 300
| | | | |
MA-S TGCGGGTGCAAACCTGGTTCGACATCTCTAATTGGCTGTGGTATATCAAAGGCCGAGGTGGTATCAAACAGCTGCAAGCACGCGTGGCAGTAGAACCG 300
* * * * *

* * * * *
MA-E TACCTGAAAGCTGGTGGCGGTAACGAACAGGAACTGCTGGAGCTGGACAAGTGGGCTTCTCTGTGGAACCGAGTGGTGGTCTGAAACTGGATCAGTGGG 400
| | | | |
MA-S TACCTGAAAGCTGGTGGCGGTAACGAACAGGAACTGCTGGAGCTGGACAAGTGGGCTTCTCTGTGGAACCGAGTGGTGGTCTGAAACTGGATCAGTGGG 400
* * * * *

* * * * *
MA-E CAGGTGGTGCAGCTCTGGATTCTGGAATGCTGGTGGCGAGCGGCTCTGGATAAGTGGGATAACGGTGTGGTGGTGCAGAACTGGACAATGGGCTGC 500
| | | | |
MA-S CAGGTGGTGCAGCTCTGGATTCTGGAATGCTGGTGGCGAGCGGCTCTGGATAAGTGGGATAACGGTGTGGTGGTGCAGAACTGGACAATGGGCTGC 500
* * * * *

* * * * *
MA-E TGCGGCAATGACTCCGTTAACAGCGCAGAAGCATCCACTGGTGCAGGTGGTGGCGGTAGCAACCCGGTTAAGTCTATGGTCTGAAGGCGCTACCTTC 600
| | | | |
MA-S TGCGGCAATGACTCCGTTAACAGCGCAGAAGCATCCACTGGTGCAGGTGGTGGCGGTAGCAACCCGGTTAAGTCTATGGTCTGAAGGCGCTACCTTC 600
* * * * *

* * * * *
MA-E AGCGCAAATCTGTGACCTGTACCTTCAGCCGTCAGTTCCTGATTCCGTACGATCCGGAGCATCACTACAAAGTGTCTCTCCGGCAGCTTCTTCCTGTC 700
| | | | |
MA-S AGCGCAAATCTGTGACCTGTACCTTCAGCCGTCAGTTCCTGATTCCGTACGATCCGGAGCATCACTACAAAGTGTCTCTCCGGCAGCTTCTTCCTGTC 700
* * * * *

* * * * *
MA-E ATAACGCCTCTGGTAAAGAAGCCAAAGTGTGCACCATTAGCCCGATCATGGGTTATTCTACTCCGTGGCGCTATCTGGATTTCAACGCGCTGAACCTGTT 800
| | | | |
MA-S ATAACGCCTCTGGTAAAGAAGCCAAAGTGTGCACCATTAGCCCGATCATGGGTTATTCTACTCCGTGGCGCTATCTGGATTTCAACGCGCTGAACCTGTT 800
* * * * *

* * * * *
MA-E CTCTCTCCGCTGGAGTCCAGCACCTGATCGAAAACACGGTCTATTGCAACCGGATGCACTGACTGTGACTATTTCTGAAATCGCTGTAAAAGACGTT 900
| | | | |
MA-S CTCTCTCCGCTGGAGTCCAGCACCTGATCGAAAACACGGTCTATTGCAACCGGATGCACTGACTGTGACTATTTCTGAAATCGCTGTAAAAGACGTT 900
* * * * *

* * * * *
MA-E ACTGACAAAACCTGGCGGTGGTGTTCAGGTGACTGACTCTACTACTGGTCTGTGTATGCTGGTAGATCAGAGTATAAGTACCCGTACGTTCTGGGCC 1000
| | | | |
MA-S ACTGACAAAACCTGGCGGTGGTGTTCAGGTGACTGACTCTACTACTGGTCTGTGTATGCTGGTAGATCAGAGTATAAGTACCCGTACGTTCTGGGCC 1000
* * * * *

* * * * *
MA-E AGGGCCAGGACACTCTGGCACCAGGCTGCCGATCTGGGTTTACTTCCACCACAGTACGCATACCTGACTGTAGGTGACGTGAACACCCAAAGGCATCTC 1100
| | | | |
MA-S AGGGCCAGGACACTCTGGCACCAGGCTGCCGATCTGGGTTTACTTCCACCACAGTACGCATACCTGACTGTAGGTGACGTGAACACCCAAAGGCATCTC 1100
* * * * *

* * * * *
MA-E CGGTGACAGCAAGAACTGGCGTCTGAAGAATCTGCTTCTATGTACTGGAACACTCCTCCTTTTCAGCTGCTGGGCACTGGTGGCACCCGCTACCATGAGC 1200
| | | | |
MA-S CGGTGACAGCAAGAACTGGCGTCTGAAGAATCTGCTTCTATGTACTGGAACACTCCTCCTTTTCAGCTGCTGGGCACTGGTGGCACCCGCTACCATGAGC 1200
* * * * *

* * * * *
MA-E TACAAATCCCACAGTTCACCCGAGAACCTGGAAGGCTGCTCCAGCATTCTATGAAATGTACAATCCACTGTATGGCTCTCGCTCTGGGTGTACCGG 1300
| | | | |
MA-S TACAAATCCCACAGTTCACCCGAGAACCTGGAAGGCTGCTCCAGCATTCTATGAAATGTACAATCCACTGTATGGCTCTCGCTCTGGGTGTACCGG 1300
* * * * *

* * * * *
MA-E ACACCTGGGTGGCGATCCGAAATCCCGTCTCTGACTCACGAAGACCACGCAATCCAGCCGAGAACTTTATGCCAGTCCGCTGGTTAACAGCGTTTC 1400
| | | | |
MA-S ACACCTGGGTGGCGATCCGAAATCCCGTCTCTGACTCACGAAGACCACGCAATCCAGCCGAGAACTTTATGCCAGTCCGCTGGTTAACAGCGTTTC 1400
* * * * *

* * * * *
MA-E CACCAAAGAAGGCGACTCTTCTTCTACTGTTGCAAGGCAAGGCCCTGACTGGCTGAGCACCGGCACTTCTCAGAACACTCGCATCTCTCTCGCTCCGGT 1500
| | | | |
MA-S CACCAAAGAAGGCGACTCTTCTTCTACTGTTGCAAGGCAAGGCCCTGACTGGCTGAGCACCGGCACTTCTCAGAACACTCGCATCTCTCTCGCTCCGGT 1500
* * * * *

* * * * *
MA-E CCGGTGAGCCAGCCGTACCACCATTTGGGACACCGACAATACGTTACTGGCATCAACGCTATCTCCACGGCCAGACTACCTACGGTAACGAGAGGACA 1600
| | | | |
MA-S CCGGTGAGCCAGCCGTACCACCATTTGGGACACCGACAATACGTTACTGGCATCAACGCTATCTCCACGGCCAGACTACCTACGGTAACGAGAGGACA 1600

```

```

* * * * *
MA-E AAGAATACCAGCAGGGCGTTGGTCGCTTCCCGAACGAAAAGGAACAGCTGAAACGCCTGCAAGGTCTGAACATGCACACCTACTTCCCGAACAAAGGCAC 1700
|||||
MA-S AAGAATACCAGCAGGGCGTTGGTCGCTTCCCGAACGAAAAGGAACAGCTGAAACGCCTGCAAGGTCTGAACATGCACACCTACTTCCCGAACAAAGGCAC 1700
* * * * *

* * * * *
MA-E CCAACAGTATACTGACCAGATCGAGCGTCCGCTGATGGTTGGTCCGATGGAATCGCCGTGCTCTGCACTACGAATCCCAGCTGTGGTCTAAGATCCCG 1800
|||||
MA-S CCAACAGTATACTGACCAGATCGAGCGTCCGCTGATGGTTGGTCCGATGGAATCGCCGTGCTCTGCACTACGAATCCCAGCTGTGGTCTAAGATCCCG 1800
* * * * *

* * * * *
MA-E AACCTGGACGATAGCTTCAAACCCAGTTTGGCGCTCTGGGTGGTGGGGTCTGCACCAACCGCCACCGCAAATCTTCTGAAAATCCTGCCGAGTCCG 1900
|||||
MA-S AACCTGGACGATAGCTTCAAACCCAGTTTGGCGCTCTGGGTGGTGGGGTCTGCACCAACCGCCACCGCAAATCTTCTGAAAATCCTGCCGAGTCCG 1900
* * * * *

* * * * *
MA-E GTCCGATGGTGGCATCAAAGCATGGGTATCACCACCTGGTTCAGTATGCCGTTGGCATCATGACCGTGACCATGACTTTCAAGTGGGTCTGCGTAA 2000
|||||
MA-S GTCCGATGGTGGCATCAAAGCATGGGTATCACCACCTGGTTCAGTATGCCGTTGGCATCATGACCGTGACCATGACTTTCAAGTGGGTCTGCGTAA 2000
* * * * *

* * * * *
MA-E AGTACTGGTGGTGAACCCGCAACCGGTGTGTATCCACCGCAGCTGGTGGTACCCTGCGTACGTACTGTACGATCGACTGCTACCGACGCGAAA 2100
|||||
MA-S AGTACTGGTGGTGAACCCGCAACCGGTGTGTATCCACCGCAGCTGGTGGTACCCTGCGTACGTACTGTACGATCGACTGCTACCGACGCGAAA 2100
* * * * *

* * * * *
MA-E CAGCACCACCGTACGGTTTCGAGAAACCGGAAGAAGTGTGGACCGCTAAAAGCCGTGTACACCCGCTGCATCACCACCATCACCCTAATACTGAATTC 2200
|||||
MA-S CAGCACCACCGTACGGTTTCGAGAAACCGGAAGAAGTGTGGACCGCTAAAAGCCGTGTACACCCGCTGCATCACCACCATCACCCTAATACTGAATTC 2200
* * * * *

MA-E AAGCTTGCG 2209
|||||
MA-S AAGCTTGCG 2209

```

Figura suplementaria 1. Alineamiento de la secuencia obtenida por secuenciación Sanger de la construcción VP2_{MultiHIV-A} clonada en el vector de expresión pET22b(+) (MA-S) vs secuencia esperada de VP2_{MultiHIV-A} (MA-E).

```

* * * * *
MB-E GGAGATATACATATGTGGCAAGAAGTTGGCAAAGCAATGTATGCTCCACCAATCGAAGGTGGTGTGGCGCTGGTCCGGGTCGCGCATTTGGTCCGGGTC 100
|||||
MB-S GGAGATATACATATGTGGCAAGAAGTTGGCAAAGCAATGTATGCTCCACCAATCGAAGGTGGTGTGGCGCTGGTCCGGGTCGCGCATTTGGTCCGGGTC 100
* * * * *

* * * * *
MB-E GTGCGTTCGGTTCGCGGTCGTGCTTTGGCGCAGGCGCAAGCACCCTCCATTCGCGGTAAGTGTCCACCAGCATCCGTGGCAAGGTAGCACTTCTATCCG 200
|||||
MB-S GTGCGTTCGGTTCGCGGTCGTGCTTTGGCGCAGGCGCAAGCACCCTCCATTCGCGGTAAGTGTCCACCAGCATCCGTGGCAAGGTAGCACTTCTATCCG 200
* * * * *

* * * * *
MB-E TGGTAAAGTGAGCACTTCCATCCGTGGTAAGGTATCTACCTCCATTGTAAGTATCTACCTCTATCCGTGGCAAGGTGTACCTCTATTCGTGGTAAA 300
|||||
MB-S TGGTAAAGTGAGCACTTCCATCCGTGGTAAGGTATCTACCTCCATTGTAAGTATCTACCTCTATCCGTGGCAAGGTGTACCTCTATTCGTGGTAAA 300
* * * * *

* * * * *
MB-E GTTTCCACCTCTATCCGTGGCAAAGTGGCTGGTCCGGTGGTCCGCTCTGTGAACCTCACCGGCAACGCGAAAATATCATCGTGGTGCAGGCGCAGAAC 400
|||||
MB-S GTTTCCACCTCTATCCGTGGCAAAGTGGCTGGTCCGGTGGTCCGCTCTGTGAACCTCACCGGCAACGCGAAAATATCATCGTGGTGCAGGCGCAGAAC 400
* * * * *

* * * * *
MB-E AAGAGCTGCTGGAAGTGGATAAGTGGGCATCCCTGTGGAACGGTGTGGCGCAATGGGTCTGGTTAAACAGATCATCAATATGTGGCAGGAAGTTGGTAA 500
|||||
MB-S AAGAGCTGCTGGAAGTGGATAAGTGGGCATCCCTGTGGAACGGTGTGGCGCAATGGGTCTGGTTAAACAGATCATCAATATGTGGCAGGAAGTTGGTAA 500
* * * * *

* * * * *
MB-E GGCTATGTACGCTCTGCTGGCACGCCAAACAATAACACCCGTAAGTCTATTACATCGGTCCAGGCCGTGCTTTCTACGCAACTGAGGCTGCGGCAATG 600
|||||
MB-S GGCTATGTACGCTCTGCTGGCACGCCAAACAATAACACCCGTAAGTCTATTACATCGGTCCAGGCCGTGCTTTCTACGCAACTGAGGCTGCGGCAATG 600
* * * * *

* * * * *
MB-E ACCAGCGTTAACTCCGTTGAAGCGTCCACTGGTGTGGTGGTGGTCTTAACCCGGTGAAGTCCATGTGGAGCGAAGGCGTACCTTACGCGGAACT 700
|||||
MB-S ACCAGCGTTAACTCCGTTGAAGCGTCCACTGGTGTGGTGGTGGTCTTAACCCGGTGAAGTCCATGTGGAGCGAAGGCGTACCTTACGCGGAACT 700
* * * * *

* * * * *
MB-E CTGTTACCTGACTTTCTCCCGTCAGTTCCTGATCCCGTACGACCCGGAACACCCTACAAAAGTGTCTCTCCGGTGCAGCTCTGTGCACACGCTTC 800
|||||
MB-S CTGTTACCTGACTTTCTCCCGTCAGTTCCTGATCCCGTACGACCCGGAACACCCTACAAAAGTGTCTCTCCGGTGCAGCTCTGTGCACACGCTTC 800
* * * * *

```

```

* * * * *
MB-E TGGCAAAGAGGCTAAAGTTTGTACCATCTCTCCGATCATGGGTTACAGCACTCCGTGGCGTTACCTGGATTTCAACGGCGTGAACCTGTCTTCAGCCCA 900
|||||
MB-S TGGCAAAGAGGCTAAAGTTTGTACCATCTCTCCGATCATGGGTTACAGCACTCCGTGGCGTTACCTGGATTTCAACGGCGTGAACCTGTCTTCAGCCCA 900
* * * * *

* * * * *
MB-E CTGGAATTCAGCATCTGATCGAAAACATATGGCTCTATCGCACCCGGATGCGCTGACCGTAACCATCAGCGAAATTCGCGTAAAAGATGTTACCGACAAAA 1000
|||||
MB-S CTGGAATTCAGCATCTGATCGAAAACATATGGCTCTATCGCACCCGGATGCGCTGACCGTAACCATCAGCGAAATTCGCGTAAAAGATGTTACCGACAAAA 1000
* * * * *

* * * * *
MB-E CTGGTGGTGGTGTTCAGGTTACTGATTCTACTACTGGTCTGTGTATGCTGGTTGACCACGAGTACAAGTACCCGTATGTGCTGGGTGAGGCCAGGA 1100
|||||
MB-S CTGGTGGTGGTGTTCAGGTTACTGATTCTACTACTGGTCTGTGTATGCTGGTTGACCACGAGTACAAGTACCCGTATGTGCTGGGTGAGGCCAGGA 1100
* * * * *

* * * * *
MB-E TACCTGGCACAGAGCTGCCGATCTGGGTTACTTCCGCCACAGTATGCCTATCTGACTGTGGGTGATGTGAACACCCAGGGCATTAGCGGTGACAGC 1200
|||||
MB-S TACCTGGCACAGAGCTGCCGATCTGGGTTACTTCCGCCACAGTATGCCTATCTGACTGTGGGTGATGTGAACACCCAGGGCATTAGCGGTGACAGC 1200
* * * * *

* * * * *
MB-E AAGAACTGGCGTCCGAGGAGTCTGCGTCTACGTGCTGGAACACTTAGCTTCCAGCTGCTGGGTACTGGTGGCACCCGACCATGTCTACAAGTTTC 1300
|||||
MB-S AAGAACTGGCGTCCGAGGAGTCTGCGTCTACGTGCTGGAACACTTAGCTTCCAGCTGCTGGGTACTGGTGGCACCCGACCATGTCTACAAGTTTC 1300
* * * * *

* * * * *
MB-E CACCAGTGCCACCAGAAAACCTGGAAGGCTGTCCAGCATTCTACGAAATGTACAATCCGCTGTATGGTCCCGCTCTGGCGCTGCCGATACCCCTGGG 1400
|||||
MB-S CACCAGTGCCACCAGAAAACCTGGAAGGCTGTCCAGCATTCTACGAAATGTACAATCCGCTGTATGGTCCCGCTCTGGCGCTGCCGATACCCCTGGG 1400
* * * * *

* * * * *
MB-E TGGTGACCCAAAGTTCGGTCTCTGACCCACGAGGACCACCGGATCCAACCGCAGAATTCATGCCAGTCCCGTGGTAACTCTGTTCCACCAAGGAA 1500
|||||
MB-S TGGTGACCCAAAGTTCGGTCTCTGACCCACGAGGACCACCGGATCCAACCGCAGAATTCATGCCAGTCCCGTGGTAACTCTGTTCCACCAAGGAA 1500
* * * * *

* * * * *
MB-E GGTGACTCTTCCCTCACTGGTGTGGCAAAGCGCTGACTGGCCTGTCTACTGGTACTTCTCAGAACACCCGCATCTCTCTGCGTCCAGTCCGGTGTCTC 1600
|||||
MB-S GGTGACTCTTCCCTCACTGGTGTGGCAAAGCGCTGACTGGCCTGTCTACTGGTACTTCTCAGAACACCCGCATCTCTCTGCGTCCAGTCCGGTGTCTC 1600
* * * * *

* * * * *
MB-E AGCCGTACCACCACTGGGATACCGACAAATACGTTACTGGCATCAACGGATCAGCCAGGCCAGACCCTACGGTAACGCCGAAGACAAGGAATACCA 1700
|||||
MB-S AGCCGTACCACCACTGGGATACCGACAAATACGTTACTGGCATCAACGGATCAGCCAGGCCAGACCCTACGGTAACGCCGAAGACAAGGAATACCA 1700
* * * * *

* * * * *
MB-E GCAGGGCGTGGGTCGTTCCCGAACGAGAAAGAACAGCTGAAGCGCTGCAAGTCTGAACATGCACACCTATTTCCGAAACAAAGGCACCCAGCAGTAC 1800
|||||
MB-S GCAGGGCGTGGGTCGTTCCCGAACGAGAAAGAACAGCTGAAGCGCTGCAAGTCTGAACATGCACACCTATTTCCGAAACAAAGGCACCCAGCAGTAC 1800
* * * * *

* * * * *
MB-E ACTGATCAGATCGAACGTCGCTGATGGTGGTAGCGTGTGGAACCGTCTGCTGCACTACGAGTCTCAACTGTGGTCCAAGATTCCGAACTGGATG 1900
|||||
MB-S ACTGATCAGATCGAACGTCGCTGATGGTGGTAGCGTGTGGAACCGTCTGCTGCACTACGAGTCTCAACTGTGGTCCAAGATTCCGAACTGGATG 1900
* * * * *

* * * * *
MB-E ACAGCTTCAAACCAATTCGCTGCTCTGGTGGTGGGGTCTGCACCAACCACCACCGAAATCTTCTGAAGATTCTGCCGAGAGCGGTCCGATTGG 2000
|||||
MB-S ACAGCTTCAAACCAATTCGCTGCTCTGGTGGTGGGGTCTGCACCAACCACCACCGAAATCTTCTGAAGATTCTGCCGAGAGCGGTCCGATTGG 2000
* * * * *

* * * * *
MB-E TGGTATCAAAGCATGGGTATTACCACCTGGTACAATATGCGTAGGTATCATGACCGTGACCATGACCTTCAAACCTGGGCTGCGTAAGGCGACTGGT 2100
|||||
MB-S TGGTATCAAAGCATGGGTATTACCACCTGGTACAATATGCGTAGGTATCATGACCGTGACCATGACCTTCAAACCTGGGCTGCGTAAGGCGACTGGT 2100
* * * * *

* * * * *
MB-E CGTGGAACCCGCAACCGGGTGTATCCGCCACATGCGGCTGGTCACTGCCGTACGTGTACGATCCGACTGCGACTGACGCAAAACAGCATCACC 2200
|||||
MB-S CGTGGAACCCGCAACCGGGTGTATCCGCCACATGCGGCTGGTCACTGCCGTACGTGTACGATCCGACTGCGACTGACGCAAAACAGCATCACC 2200
* * * * *

* * * * *
MB-E GTCATGGCTTTGAAAAGCCGGAAGAGCTGTGGACTGCGAAATCCCGTGTTCACCCGCTGCACCACCACCATCATCACTAATACTGAATTCAGGCTTGGC 2299
|||||
MB-S GTCATGGCTTTGAAAAGCCGGAAGAGCTGTGGACTGCGAAATCCCGTGTTCACCCGCTGCACCACCACCATCATCACTAATACTGAATTCAGGCTTGGC 2299
* * * * *

```

Figura suplementaria 2. Alineamiento de la secuencia obtenida por secuenciación Sanger de la construcción VP2_{MultiHIV-B} clonada en el vector de expresión pET22b(+) (MB-S) vs secuencia esperada de VP2_{MultiHIV-B} (MB-E).