



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



Posgrado en Ciencias en Ingeniería Química

**Producción de candidatos vacunales contra SARS-CoV-2
basados en nanopartículas de oro**

Tesis que para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias en Ingeniería Química

Presenta:

Sánchez Gil Mariana del Carmen

Director de Tesis: **Dr. Omar González Ortega**

Codirector de tesis: **Dr. Sergio Rosales Mendoza**

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.

JULIO, 2024



UASLP-Sistema de Bibliotecas

Repositorio Institucional Tesis Digitales Restricciones de Uso DERECHOS RESERVADOS

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en este Trabajo Terminal está protegido por la Ley Federal de Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos.

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 de origen, mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto o con fines de lucro, reproducción, edición o modificación será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Producción de candidatos vacunales contra SARS-CoV-2 basados en nanopartículas de oro © 2024 by Sánchez Gil Mariana del Carmen is licensed under [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Este proyecto fue realizado en el *Laboratorio de Bioseparaciones* adscrito a la *Universidad Autónoma de San Luis Potosí*, en el periodo comprendido entre *julio de 2023 a junio de 2024*, bajo la dirección del *Dr. Omar González Ortega* y el *Dr. Sergio Rosales Mendoza* y fue apoyado por el *Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (proyecto Fronteras de la Ciencia-2019, no. 848290)* obteniendo recursos para la realización del trabajo.

El programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados de Calidad (SNP) del CONAHCYT, registro 000896. Número de la beca otorgada por CONAHCYT: 829581. Número de CVU:1243238.

Los datos del trabajo titulado *Producción de candidatos vacunales contra SARS-CoV-2 basados en nanopartículas de oro* están bajo el resguardo de la *Facultad de Ciencias Químicas* y pertenecen a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
Facultad de Ciencias Químicas
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado
Posgrado en Ciencias en Ingeniería Química
Programa de Maestría

Solicitud de Registro de Tesis Maestría

San Luis Potosí SLP a 24/Nov/2022

Comité Académico

En atención a: Coordinador/a del Posgrado

Por este conducto solicito a Usted lleve a cabo el registro de tema de tesis de Maestría, el cual quedo definido de la siguiente manera: Producción de candidatos vacunales contra SARS-CoV-2 a base de nanopartículas de oro

que desarrollará la estudiante: Mariana del Carmen Sánchez Gil

bajo la dirección y/o Codirección de: Dr. Omar González Ortega y Dr. Sergio Rosales Mendoza

Asimismo, le comunico que el proyecto en el cual trabajará el alumno involucrará el manejo de animales de experimentación, estudios con seres humanos o muestras derivadas de los mismos, el manejo y/o generación de organismos genéticamente modificados y requiere de aval de Comité de Ética e investigación de la FCQ.

() Sí debido a que: _____

() No

(X) No Aplica

Sin otro particular, quedo de Usted.

ATENTAMENTE

Mariana del Carmen Sánchez Gil

Dr. Omar González Ortega



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



Posgrado en Ciencias en Ingeniería Química

Producción de candidatos vacunales contra SARS-CoV-2 basados en nanopartículas de oro

Tesis que para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias en Ingeniería Química

Presenta:

Sánchez Gil Mariana del Carmen

SINODALES:

Presidente: Dr. Mariano de Jesús García Soto

Secretario: Dr. Omar González Ortega

Vocal: Dr. Raúl Ocampo Pérez

Vocal: Dr. Sergio Rosales Mendoza

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.

JULIO, 2024

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORIAL ACADÉMICO

Dr. Omar González Ortega: Director de tesis. Adscrito al Posgrado en Ciencias en Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dr. Sergio Rosales Mendoza: Codirector de tesis. Adscrito al Posgrado en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dr. Mariano de Jesús García Soto: Tutor de tesis. Adscrito al Posgrado en Ciencias en Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dr. Raúl Ocampo Pérez: Tutor de tesis. Adscrito al Posgrado en Ciencias en Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
Facultad de Ciencias Químicas
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado
Posgrado en Ciencias en Ingeniería Química
Programa de Maestría

Carta Cesión de Derechos

San Luis Potosí, S.L.P., a Julio / 5 / 2024

En la ciudad de San Luis Potosí el día 5 del mes de julio del año 2024. El que suscribe Mariana del Carmen Sánchez Gil Alumno(a) del programa de posgrado en Ciencias en Ingeniería Química adscrito a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo terminal, realizado bajo la dirección de: Dr. Omar González Ortega y Dr. Sergio Rosales Ortega y cede los derechos del trabajo titulado Producción de candidatos vacunales contra SARS-CoV-2 basados en nanopartículas de oro a la **Universidad Autónoma de San Luis Potosí**, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir de forma total o parcial texto, gráficas, imágenes o cualquier contenido del trabajo si el permiso expreso del o los autores. Éste, puede ser obtenido directamente con el autor o autores escribiendo a la siguiente dirección marianasanchez.gil@hotmail.com. Si el permiso es otorgado, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Nombre y firma del alumno



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
Facultad de Ciencias Químicas
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado
Posgrado en Ciencias en Ingeniería Química
Programa de Maestría

Carta de Análisis de Similitud

San Luis Potosí SLP a julio / 01 / 2024

L.B. María Zita Acosta Nava
Biblioteca de Posgrado FCQ

Asunto: Reporte de porcentaje de similitud de tesis de grado

Por este medio me permito informarle el porcentaje de similitud obtenido mediante iThenticate para la tesis titulada Producción de candidatos vacunales contra SARS-CoV-2 basados en nanopartículas de oro presentada por el autor Mariana del Carmen Sánchez Gil. La tesis es requisito para obtener el grado de Maestría en el Posgrado en Ciencias en Ingeniería Química. El análisis reveló un porcentaje de similitud de 20% excluyendo referencias y metodología.

Agradezco sinceramente su valioso tiempo y dedicación para llevar a cabo una exhaustiva revisión de la tesis. Quedo a su disposición para cualquier consulta o inquietud que pueda surgir en el proceso.

Sin más por el momento, le envío un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Dr. Erik César Herrera Hernández
Coordinador Académico del Posgrado
en Ciencias en Ingeniería Química

*A Rita, por no dejarme sola en mis noches largas de escritura y ser mi fiel
acompañante.*

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quiero agradecer a mis papás, sin ellos haber entrado a la maestría no hubiera sido posible, por apoyarme con mi sueño de hacer un posgrado y seguir preparándome, porque ven lo mejor de mí cuando yo no puedo verlo, por ser mi fuerza cuando estaba en momentos débiles, por todos sus consejos académicos y no académicos, por tener fe en mí y amarme incondicionalmente. Nunca les podré expresar lo agradecida con ustedes, pero este trabajo es gracias a ustedes.

Les agradezco infinitamente a mis hermanos, Manuel y Mauricio, por hacerme reír en mis momentos de estrés, por ser mis personas incondicionales, y por verme como su ejemplo a seguir, aunque realmente ellos son mi ejemplo por seguir todos los días.

Le agradezco a Rubén, mi novio, por no dejar que me saliera de la maestría cuando yo no me sentía suficiente para ella, por siempre creer y confiar en mí, por sacrificar sus días libres para ir a motivarme a estudiar y no darme por vencida con la tesis y sobre todo por ser mi lugar seguro.

Le agradezco al Dr. Omar González Ortega por aceptarme en su grupo de trabajo y creer en mí, por sus asesorías y no dejarme sola durante la elaboración del proyecto; este proyecto es en gran medida por usted. Por la gran paciencia que tuvo al explicarme nuevos términos y seguir explicándome hasta que los entendiera. Le estoy inmensamente agradecida por sus consejos, su tiempo y sus correcciones que me ayudaron a mejorar como alumna, persona y futura investigadora.

Le agradezco al Dr. Mariano García Soto por todo el tiempo, consejos, disposición y paciencia para orientarme en todo momento en la realización del proyecto, gran parte del trabajo es gracias a usted. Por todos esos momentos en el pizarrón explicándome metodologías y siempre ser amable ante mis dudas. Por las pláticas durante el café en donde compartió un poco de la gran persona que es.

Les agradezco al Dr. Sergio Rosales y al Dr. Raúl Ocampo por sus comentarios, correcciones y consejos en cada avance de mi proyecto que me ayudaron a mejorarlo y complementarlo. Muchas gracias por su apoyo a lo largo de estos dos años.

Les agradezco a Say, Liz y Marijo por los cafés con pan que hacían el día más agradable, por tenerme paciencia al enseñarme sobre las técnicas y programas que no conocía, y brindarme su amistad en este proceso. Las llevaré en mi corazón para siempre.

Un agradecimiento a Caro por apoyarme con mis experimentos y darme sus consejos para realizar mis cinéticas, sin ti no hubiera logrado obtener datos.

Agradecerles a mis compañeros de maestría, Víctor, Brenda, Jitzell y Antonio y porque sin ellos no hubiera logrado pasar las materias y agradecerles por hacer el tiempo en la maestría más ameno.

Y finalmente agradecer a mis amigos de toda la vida, Natalia, Diana, Fey, Fer, Andy, Denisse, Víctor y Lei por escuchar mis quejas, no dejarme sola, quererme y tener un consejo para mí cuando lo requería.

RESUMEN

A lo largo de los años la humanidad ha sido afectada por diversos microorganismos que han cobrado millones de vidas. En este aspecto el desarrollo de vacunas es una respuesta crítica contra futuras pandemias y las nanovacunas representan una opción prometedora.

Este trabajo estudió la conjugación de diversas proteínas modelo (lisozima, α -quimotripsina, albúmina de suero bovino e inmunoglobulina G humana de plasma sanguíneo) y dos proteínas recombinantes (LTB-p50 y LTB-PRRSV) por medio de fisisorción en nanopartículas de oro, sintetizadas por el método de Turkevich modificado, obteniendo dos tamaños, 20 y 40 nm.

Distintos valores de pH y de concentración de proteína fueron evaluados para obtener las mejores condiciones de adsorción de proteína en las nanopartículas. La conjugación con nanopartículas de oro de 20 nm y en un pH cercano al punto isoeléctrico de la proteína resultó en mayor estabilidad y un aumento en la adsorción de la proteína. Fue observado que no solo las interacciones electrostáticas están involucradas en el mecanismo de adsorción, también las interacciones hidrofóbicas y de van der Waals son relevantes en este proceso.

Al usar diversas proteínas modelo de diferentes pesos moleculares resultó importante el tamaño que poseen ya que dan protección estérica a las nanopartículas evitando la formación de aglomerados y agregados.

Este estudio provee evidencia de que es posible conjugar proteínas recombinantes a nanopartículas de oro, para obtener conjugados estables y producir un candidato vacunal para enfermedades virales que afectan a la población de todo el mundo.

Palabras clave: Nanopartículas de oro; proteínas recombinantes; fisisorción; nanovacunas

ABSTRACT

Over the years, humanity has been affected by various microorganisms that have claimed millions of lives. In this regard, the development of vaccines is a critical response against future pandemics, and nanovaccines represent a promising possibility.

This study investigated the conjugation of various model proteins (lysozyme, α -chymotrypsin, bovine serum albumin, and human immunoglobulin G from blood plasma) and two recombinant proteins (LTB-p50 and LTB-PRRSV) through physisorption onto gold nanoparticles synthesized using the modified Turkevich method, yielding particles of 20 and 40 nm in size.

Different pH values and protein concentrations were evaluated to determine optimal conditions for protein adsorption onto the nanoparticles. Conjugation with 20 nm gold nanoparticles at a pH near the protein's isoelectric point resulted in greater stability and increased protein adsorption. It was observed that electrostatic interactions alone were not solely involved for the adsorption mechanism; hydrophobic and van der Waals interactions also have significant roles in this process.

The use of model proteins with varying molecular weights proved crucial as they provided steric protection to the nanoparticles, preventing agglomeration and aggregation.

This study provides evidence that recombinant proteins can be conjugated to gold nanoparticles to produce stable conjugates, offering a potential vaccine candidate against viral diseases affecting populations worldwide.

Key words: Gold nanoparticles; recombinant proteins; physisorption; nanovaccines

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Naturaleza de los virus.....	4
2.2. Virus respiratorios	5
2.3. Brotes epidémicos en humanos	5
2.4. Brotes epidémicos en ganado.....	6
2.5. Coronavirus.....	7
2.5.1. SARS-CoV-2.....	8
2.6. Desarrollo de vacunas contra el SARS-CoV-2.....	9
2.7. Tipos de vacunas	10
2.7.1. Vacunas de primera generación	11
2.7.2. Vacunas de segunda generación	11
2.7.3. Vacunas de tercera generación.....	12
2.8. Nanopartículas de oro (AuNP)	13
2.9. Síntesis de nanopartículas de oro (AuNP)	13
2.9.1. Método de Turkevich	14
2.9.2. Método de Frens.....	15
2.10. Caracterización de las AuNP	15
2.10.1. Espectrofotometría	15
2.10.2. Dispersión de Luz Dinámica.....	16
2.10.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	16
2.11. Funcionalización de proteínas en AuNP (bioconjugación).....	17
2.12. Factores importantes en la conjugación AuNP-proteína.....	18

2.13.	Vacunas utilizando nanopartículas de oro	19
3.	JUSTIFICACIÓN	21
4.	HIPÓTESIS	22
5.	OBJETIVOS	22
5.1.	Objetivo general	22
5.2.	Objetivos específicos	22
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	23
6.1.	Síntesis de nanopartículas de oro (AuNP)	23
6.2.	Conjugados AuNP-proteínas modelo y estudio de adsorción	24
6.2.1.	Evaluación del efecto del pH en la adsorción de proteína en AuNP	25
6.2.2.	Cinética de adsorción	26
6.3.	Conjugados AuNP-proteínas recombinantes	26
6.3.1.	Conjugado AuNP-LTB-p50	26
6.3.2.	Conjugado AuNP-LTB-PRRSV	27
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
7.1.	Síntesis de Nanopartículas de oro (AuNP).....	28
7.2.	Conjugados AuNP-Proteína y estudio de adsorción	30
7.2.1.	Conjugado AuNP-LTB-p50	34
7.3.	Evaluación del efecto del pH y el polisorbato en la adsorción de proteínas modelo en AuNP	35
7.3.1.	Conjugados de AuNP con lisozima (Lyz).....	35
7.3.2.	Conjugados de AuNP con quimotripsina (CMT)	37
7.3.3.	Conjugados de AuNP con albúmina de suero bovino (BSA)	40
7.3.4.	Conjugados de AuNP con inmunoglobulina humana (IgGH)	42

7.4. Cálculo de monocapas de proteína sobre AuNP	44
7.5. Cinética de adsorción.....	45
7.6. Conjugado AuNP-LTB·PRRSV	47
8. CONCLUSIONES	50
9. BIBLIOGRAFÍA	52

1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de los años la humanidad ha sido afectada por una infinidad de microorganismos que han cobrado millones de vidas y han causado impactos importantes en el sector salud, la sociedad y la economía. Uno de los microorganismos que tiene la capacidad de alcanzar una alta tasa de morbimortalidad son los virus. La replicación viral requiere que una partícula viral infecte a una célula hospedera, conduciendo a alteraciones en su fisiología y eventualmente su muerte. La muerte celular con frecuencia provoca daño a diversos tejidos generando múltiples enfermedades en humanos y animales (Ahmad Nafees et al., 2011).

La investigación biomédica ha permitido el desarrollo de vacunas y tratamientos efectivos contra diversos virus. El ejemplo más reciente es la pandemia de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), causada por el coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2), la cual tuvo un impacto que hoy en día sigue presentando problemáticas tanto en la salud pública como en la economía global. Paralelamente, el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) sigue representando una amenaza significativa para la industria porcina desde el siglo pasado, causando grandes pérdidas económicas a nivel mundial.

Desde su introducción, el desarrollo de vacunas es esencial debido a que éstas activan las defensas naturales del organismo para que se entrenen y combatan infecciones específicas (OMS, 2024). Las estrategias de vacunación contra virus incluyen vacunas de primera, segunda y de tercera generación. En este contexto, la convergencia de la bio y nanotecnología y la inmunología ofrece nuevas oportunidades para el desarrollo de candidatos vacunales más efectivos, seguros y baratos, a saber, a través de nanovacunas, en las que las propiedades singulares de los nanomateriales son aprovechadas para lograr una formulación más eficaz (Yadav et al., 2020).

Uno de los materiales más estudiados en el campo de las nanovacunas son las nanopartículas de oro (AuNP), que han surgido como una plataforma promisorio debido a sus propiedades, como biocompatibilidad, facilidad de funcionalización y capacidad para inducir respuestas inmunitarias (Salazar-González et al., 2015).

Existen distintos métodos para sintetizar AuNP, pero los más usados son el método de Turkevich y el método de Frens. La síntesis ocurre en un medio acuoso, en donde una solución de citrato de sodio es mezclada con una solución de ácido cloroáurico (HAuCl₄), lo que da lugar a AuNP por reducción con carga negativa estabilizadas electrostáticamente debido a los iones de citrato adsorbidos en la superficie (Farfán-Castro et al., 2023).

Una de las formas de utilizar AuNP como vehículo vacunal consiste en funcionalizar las AuNP con proteínas antigénicas por medio de fisisorción, en donde la proteína puede adsorberse en la superficie de las AuNP mediante interacciones electrostáticas, hidrofóbicas, de van der Waals y enlaces dativos (Salazar-González et al., 2015).

Este trabajo busca establecer las condiciones de pH, concentración de proteína y tiempo de adsorción de proteínas modelo como recombinantes que permitan funcionalizar nanopartículas de oro. Esto para producir conjugados estables y que tengan la cantidad necesaria de inmunógeno en la superficie para generar una formulación vacunal de prueba contra SARS-CoV-2 y PRRSV, con la menor cantidad de proteína recombinante, dado que un objetivo importante es minimizar la dosis de antígeno dado su alto costo.

Para encontrar las condiciones apropiadas para conjugar AuNP con proteínas recombinantes, AuNP de 20 y 40 nm fueron preparadas con la finalidad de conocer el impacto que tiene en la adsorción el tamaño de partícula. Además, la caracterización de los conjugados fue mediante cuantificación directa (SDS-PAGE) e indirecta (espectrofotometría) de la concentración de proteína adsorbida en AuNP.

El presente trabajo de tesis incluye antecedentes en el capítulo 2 para contextualizar la necesidad de desarrollar candidatos vacunales por medio de plataformas novedosas, además de una revisión de trabajos hechos respecto a este tema, y algunos de sus resultados.

El capítulo 6 describe la metodología para la síntesis de AuNP de 20 y 40 nm, así como el protocolo desarrollado para la preparación de los conjugados con proteínas modelo,

las cuales incluyeron lisozima, α -quimotripsina, albúmina de suero bovino e inmunoglobulina G. Este implicó encontrar condiciones adecuadas de pH y la concentración en donde los conjugados son estables. Lo anterior permitió definir mejores condiciones al momento de usar proteína recombinante en cantidades medidas para los ensayos. Las proteínas recombinantes empleadas para la conjugación con las nanopartículas fueron LTB-p50, como antígeno para ser usada como vacuna contra el SARS-CoV-2 y la proteína recombinante LTB-PRRSV, que es un candidato vacunal contra la enfermedad PRRS, que afecta al ganado porcino.

El capítulo 7 contiene los resultados obtenidos de los ensayos realizados durante la elaboración del proyecto, planteando la interpretación de los resultados obtenidos. Con los primeros ensayos la conclusión fue que es preciso contar con un exceso de proteína para tener conjugados estables. Además de que es necesario añadir polisorbato 20 para la viabilidad de los conjugados.

Las pruebas para estudiar la estabilidad y adsorción de proteínas modelos sobre AuNP con distintos valores de pH mostraron que proteínas con mayor tamaño ofrecen una protección estérica evitando la formación de aglomerados/agregados. Además, las nanopartículas de oro de un tamaño promedio de 20 nm generan conjugados más estables, pero es vital contar con índices de polidispersidad bajos para obtener conjugados más homogéneos y de menor tamaño. La conjugación en un pH cercano al punto isoeléctrico de la proteína va a favorecer la adsorción sobre las nanopartículas de oro, debido a los diferentes mecanismos que están involucrados en la fisisorción de proteínas sobre nanopartículas de oro.

La conclusión más importante señala que es crucial continuar con la optimización de la generación de nanoconjugados que permitan avanzar en el desarrollo de formulaciones capaces de inducir una respuesta inmune robusta y protectora contra el patógeno de interés.

2. ANTECEDENTES

2.1. Naturaleza de los virus

Un virus es un microorganismo constituido de un conjunto de genes, compuestos de DNA o RNA, empacados en un recubrimiento que contiene proteínas. Los virus poseen una gran dependencia de la célula hospedadora y aquellos que infectan a los humanos son llamados virus humanos, pero están considerados junto con la clase general de virus animales.

La reproducción viral requiere que una partícula viral infecte a una célula hospedera apropiada y puede producir desde cientos a cientos de miles de viriones nuevos, lo que genera con frecuencia la muerte celular o bien una alteración en su fisiología. La muerte celular con frecuencia provoca el daño a tejidos induciendo múltiples enfermedades en humanos y animales.

La estructura básica de todos los virus coloca al genoma de ácidos nucleicos (DNA o RNA) dentro de una cubierta proteica llamada cápside. Los genomas de los virus con envoltura forman un complejo proteico y una estructura llamada nucleocápside. Las estructuras de proteínas o glucoproteínas llamadas espículas, que a menudo sobresalen de la superficie de las partículas virales, están implicadas en el contacto inicial con las células y su ingreso a las mismas (**Figura 1**) (Ahmad Nafees et al., 2011).

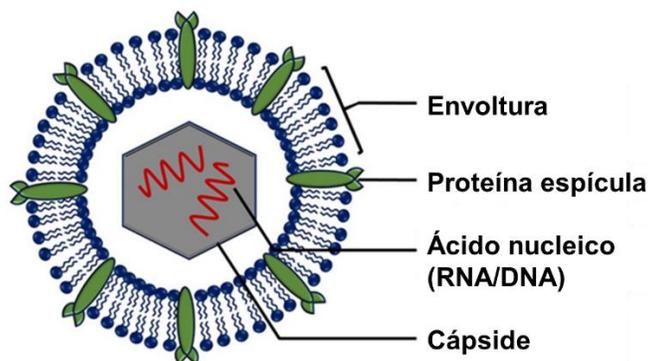


Figura 1. Estructura de un virus envuelto (Pattnaik & Chakraborty, 2020).

2.2. Virus respiratorios

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce que algunas Enfermedades Respiratorias Agudas causan brotes a gran escala, con alta morbilidad y mortalidad; por lo que constituyen una emergencia para la salud pública. En México, en 2017, a través de la Secretaría de Salud fueron reportados más de 26 millones de casos de infecciones respiratorias agudas y la mayoría de origen viral (Díaz-Chiguer et al., 2019).

Aunque la mayoría de las infecciones respiratorias solo afectan al tracto respiratorio superior (catarro común, rinitis y faringoamigdalitis), alrededor del 5% de las infecciones puede afectar al tracto respiratorio inferior y producir enfermedades que puedan requerir ingreso hospitalario (bronquitis, bronquiolitis y neumonía) (Wylie, 2017). Los virus que son la principal causa de enfermedades respiratorias agudas incluyen los virus de influenza, de parainfluenza, rinovirus, adenovirus, virus sincitial respiratorio (VSR), metaneumovirus humano (MNVh) y coronavirus respiratorios (Ahmad Nafees et al., 2011).

2.3. Brotes epidémicos en humanos

En las últimas décadas, a nivel mundial los brotes epidémicos de virus respiratorios han presentado un reto para la salud pública. Algunos ejemplos son, en 2002, el brote de coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV), en 2009 la pandemia de influenza A H1N1 y últimamente la pandemia de la enfermedad por coronavirus de 2019 (COVID-19) que paralizó al mundo. El último brote promovió la necesidad de desarrollar vacunas en tiempo récord. Estos eventos han demostrado la capacidad de los virus respiratorios para propagarse rápidamente y causar impactos significativos en la salud, la sociedad y la economía.

El virus de la influenza A fue responsable de tres pandemias mundiales en el siglo pasado: la gripe española en 1918, la gripe asiática en 1957 y la gripe de Hong Kong en 1968. Los brotes del virus de la influenza ocurren cada año, pero la gravedad varía dependiendo de la cepa. La cepa H1N1, que surgió en abril de 2009, de influenza de origen porcino se convirtió en la primera pandemia del siglo XXI que afectó a más de

214 países y generó más de 18,449 muertes (V. C. C. Cheng et al., 2012). En los últimos 30 años, dos virus aviares altamente patógenos, los virus H5N1 y H7N9, han causado enfermedades respiratorias graves y han provocado una alta tasa de mortalidad en humanos (Jiang et al., 2020).

No solo el virus de la influenza ha causado brotes epidémicos respiratorios a nivel mundial: el coronavirus ha sido causante de la pandemia más grande del siglo. En diciembre de 2019, un nuevo coronavirus, el SARS-CoV-2, provocó una epidemia de neumonía en Wuhan, provincia de Hubei, China. La epidemia se propagó en diversos países en los meses siguientes y finalmente se convirtió en una pandemia mundial en marzo de 2020. La neumonía fue nombrada oficialmente COVID-19 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Jiang et al., 2020). Este brote no llegó sin previo aviso, entre 2002 y 2003, el SARS-CoV-1 provocó uno que se volvió global, con 8000 casos, afortunadamente fue posible detenerlo antes de su expansión. En 2012, el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) fue detectado por primera vez en Arabia Saudita, y un gran brote de MERS-CoV en 2015 en Corea del Sur fue detenido con rigurosas intervenciones no farmacéuticas (Krammer, 2023). Un dato alarmante es la vigilancia en la vida silvestre en el sudeste asiático, ya que está demostrado que los coronavirus similares al SARS que infectaban fácilmente las células humanas circulaban en los murciélagos de la zona (Menachery et al., 2015).

2.4. Brotes epidémicos en ganado

Es importante recalcar que no solo hay epidemias que afectan a humanos, también existen epidemias en animales, que además de las pérdidas de ganado, producen grandes pérdidas económicas. En especial los virus respiratorios en ganado porcino son un problema en la salud de los animales, la reproducción, productividad y el bienestar económico de los productores y un impacto de la cadena de suministro de alimentos.

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) ha sido una de las enfermedades porcinas de mayor importancia económica en todo el mundo durante más de dos décadas. El costo a la industria porcina estadounidense es de al menos

600 millones de dólares anuales (Lunney et al., 2016). El virus del PRRS (PRRSV) surgió por primera vez a fines de la década de 1980 como una enfermedad “misteriosa” que se propagó entre las poblaciones porcinas tanto en Europa como en América del Norte. En los 25 años transcurridos desde la primera aparición del PRRSV, ha producido una epidemia global casi mundial causada por un conjunto de cepas emergentes. Actualmente sigue siendo la enfermedad porcina más devastadora económicamente y contribuye al deterioro de la salud animal a través de la enfermedad (Kappes & Faaberg, 2015).

Desafortunadamente, aún no ha sido posible desarrollar una vacuna eficaz para prevenir el PRRS. Ya han sido probadas vacunas de ADN, vacunas de subunidades y vacunas vectorizadas por virus, pero su valor potencial como reemplazos de las vacunas de virus vivos modificados (MLV, *modified live virus*) actualmente en uso para el PRRSV sigue siendo incierto (Nan et al., 2017). Así, es de vital importancia desarrollar una vacuna que sea eficaz para la prevención de PRRS, especialmente dirigidas a las cepas circulantes en una región de interés. Hay proteínas recombinantes desarrolladas contra este virus, pero aún falta probarlas y comprobar su efectividad.

2.5. Coronavirus

Los coronavirus que contienen un genoma RNA de cadena única y sentido positivo están rodeados por una envoltura que incluye una bicapa lipídica (**Figura 2**).

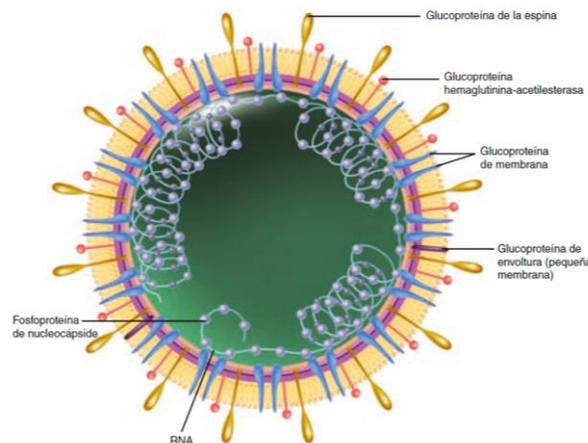


Figura 2. Estructura de un coronavirus (Ahmad Nafees et al., 2011).

Las espículas en forma de pétalo o maza (peplómeros), que miden aproximadamente 13 nm y surgen desde la superficie de la envoltura, les dan la apariencia de una corona de espinas o corona solar. Los péptidos que representan epítopes neutralizantes constituyen antígenos promisorios para el desarrollo de vacunas (Ahmad Nafees et al., 2011).

2.5.1. SARS-CoV-2

Hablando de coronavirus, la pandemia de COVID-19 transformó radicalmente la vida en todo el mundo y en la salud pública, desde entonces ha desafiado a la ciencia, la medicina y la sociedad en su conjunto. El virus causal, perteneciente a la familia de los coronavirus, es el SARS-CoV-2, cuyas siglas significan coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo severo. Este virus tiene cuatro proteínas estructurales: espícula (S), membrana (M), envoltura (E) y nucleocápside (N) (**Figura 3**) y entra en las células hospederas a través de endocitosis que implica tres pasos, unión, escisión y fusión (Manna et al., 2022). Este virus se une a los receptores de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) presentes en gran parte de los tejidos del cuerpo, con una mayor prevalencia en los pulmones, el corazón y los riñones.

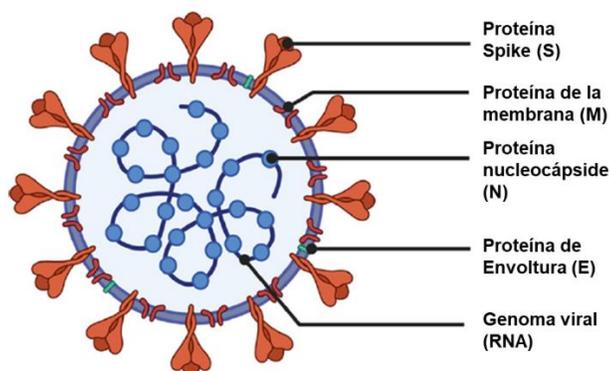


Figura 3. Estructura del SARS-CoV-2 (Rando et al., 2023).

La proteína espícula está compuesta por dos subunidades funcionales, S1 y S2; la primera se une al receptor de ACE2 y la segunda es responsable de la fusión viral

(Manna et al., 2022). La unión de la subunidad S2 permite la inserción del genoma de ARN en las células huésped, que luego sufre escisiones proteolíticas por parte de las proteasas del hospedero y traducción para formar poliproteínas que luego se ensamblan para formar complejos de replicación-transcripción. Una vez formado el complejo, las proteínas estructurales son sintetizadas en el citoplasma y ensambladas con ayuda del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi. Las partículas virales se liberan de la célula por exocitosis y tienen la capacidad de infectar otras células y continuar el proceso de replicación (**Figura 4**) (Rando et al., 2023).

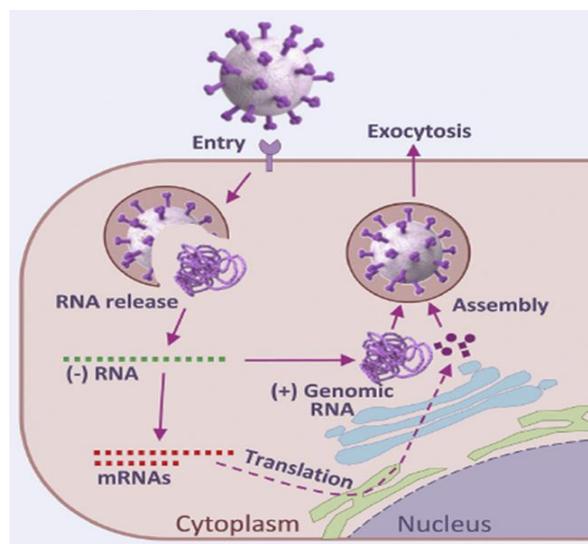


Figura 4. Diagrama resumen del ciclo de vida de CoV (Jiang et al., 2020).

2.6. Desarrollo de vacunas contra el SARS-CoV-2

Desde el 30 de diciembre de 2019, la OMS ha notificado más de 775 millones de casos y más de 7 millones de muertes a causa de la enfermedad provocada por el SARS-CoV-2 (WHO, 2024). Esta pandemia afectó la vida en general de todo el mundo, pero dio lugar a un desarrollo sin precedente de vacunas con tecnologías novedosas. Aunque la enfermedad ya no es considerada una pandemia desde mayo de 2023, la COVID-19 sigue presente y es un peligro latente para las personas de alto riesgo, por lo que seguir en busca de desarrollados candidatos vacunales con adyuvantes libres de patente, económicos y efectivos es un reto aún.

Convencionalmente, una vacuna puede tardar al menos 10 años desde su concepción hasta su implementación. Las vacunas candidatas son probadas primero de manera preclínica con modelos in vitro y animales para determinar su inmunogenicidad y toxicidad. Luego, deben completar tres fases de pruebas clínicas antes de obtener la autorización (Calvo Fernández & Zhu, 2021).

El desarrollo, producción y aprobación de las diferentes vacunas contra COVID-19 en tiempo récord ha dado como resultado que hasta febrero de 2022 fueran administradas aproximadamente 13,000 millones de dosis en todo el mundo. La mayoría de las vacunas son basadas en la proteína espícula (S), que desempeña un papel fundamental en la entrada del virus a las células diana (Calvo Fernández & Zhu, 2021). El dominio de unión al receptor (RBD, *receptor binding domain*) forma parte de la subunidad S1, particularmente el segmento comprendido por los aminoácidos 319-541.

Ejemplos de las vacunas que han sido autorizadas para uso de emergencia contra COVID-19 son CanSino, Covaxin, Johnson & Johnson, Moderna, Oxford/AstraZeneca, Pfizer/BioNTech, Sinopharm, Sinovac, Sputnik Light, Sputnik V, Novavax, KoviVac/Chumakov, IMBCAMS, KCONVAC, Z2001, Abdala, Soberana Plus y 02, Sanofi/GSK, Corbevax, COVIran Barekat, QazVac y EpiVacCorona (Wong-Arce et al., 2024). La mayor parte de las vacunas contra COVID-19 autorizadas están basadas en ARNm, adenovirus y tecnologías de virus inactivados, pero ha habido un esfuerzo sustancial para desarrollar vacunas de subunidades (Wong-Arce et al., 2024).

2.7. Tipos de vacunas

Las vacunas que emulan la infección natural son uno de los logros más sorprendentes en la historia de la medicina humana, ya que salvan varios millones de vidas cada año (Badgujar et al., 2020). En el sector de la salud pública, estas vacunas tienen un impacto mundial en la mejora del nivel de vida de los seres humanos y los animales, al punto de erradicar enfermedades por completo.

Las estrategias de desarrollo de vacunas antivirales incluyen vacunas de primera generación (vacunas vivas atenuadas e inactivadas), vacunas de segunda generación

(vacunas basadas en subunidades proteicas y vectores) y vacunas de tercera generación (vacunas basadas en ácidos nucleicos y nanomateriales) (Yadav et al., 2020).

2.7.1. Vacunas de primera generación

Una vacuna viva atenuada desarrolla una respuesta inmunitaria protectora sin producir síntomas reales relacionados con la enfermedad en el hospedero. Sin embargo, estas vacunas presentan problemas de seguridad, por ejemplo, el virus de la cepa viva atenuada puede volver a su forma patógena original o desarrollar una cepa virulenta más potente y mutante. Además de esto, tiene inconvenientes como la falta de idoneidad de la vacunación para la población inmunológicamente comprometida, la reversión a la virulencia y la aparición de una respuesta baja en huéspedes inmunodeprimidos que tienen comorbilidades (Badgujar et al., 2020).

Las vacunas inactivadas preservan el carácter antigénico de las partículas del virus y carecen de capacidad infectiva. Varias formulaciones de vacunas inactivadas han sido empleadas en el combate contra influenza, poliomelitis, hepatitis A y rabia (Badgujar et al., 2020). Dichas vacunas son eficaces y seguras, sin embargo, sus limitantes incluyen el requerimiento de dosis múltiples y una inmunogenicidad menor respecto a las vacunas atenuadas (Yadav et al., 2020).

2.7.2. Vacunas de segunda generación

Una vacuna de subunidades proteicas implica el uso de subunidades proteicas sintéticas, nativas o recombinantes (Vartak & Sucheck, 2016). Algunos ejemplos de este tipo de vacunas son las aplicadas contra el virus del papiloma humano, hepatitis B, neumonía y meningitis.

El dominio de unión al receptor es el segmento proteico más utilizado en el diseño de vacunas de subunidades contra coronavirus debido a su capacidad para inducir anticuerpos neutralizantes. La principal ventaja de estas vacunas es la menor probabilidad de inducir efectos adversos, ya que la formulación solo contiene una fracción del patógenos. Sin embargo, algunos reportes sugieren que la respuesta

inmune inducida por el RBD es modesta, así es necesario un adyuvante específico para alcanzar la potencia adecuada (He et al., 2004).

Las vacunas basadas en vectores virales emplean virus como herramienta de transferencia del ácido nucleico codificante del antígeno de interés. Entre los virus empleados para este fin están los adenovirus (Bouard et al., 2009).

El principal desafío en el diseño de este tipo de vacunas es conocer la epidemiología, la genotoxicidad y la virología exacta de ambos virus (virus patógeno y virus vector) (Badgujar et al., 2020). Otro obstáculo para el desarrollo de este tipo de vacuna es la existencia de preinmunidad contra el vector en la población a vacunar, lo cual afecta seriamente la eficacia de la vacuna.

2.7.3. Vacunas de tercera generación

Las vacunas de ácido nucleicos inducen una expresión transitoria del antígeno vacunal en las células de individuo vacunado (Badgujar et al., 2020). Estas vacunas poseen ventajas singulares, tales como su producción rápida y relativamente universal.

Hay reportes sobre el uso de genes N, S, S1, S2 o múltiples genes de epítomos para diseñar vacunas de ácidos nucleicos contra enfermedades causadas por coronavirus.

La principal ventaja de la vacuna de ácidos nucleicos es el uso seguro en combinación con otras plataformas de vacunas (como atenuadas o inactivadas), sin riesgo de infección, mejor estabilidad térmica y de vida útil (Zakhartchouk et al., 2005). La principal limitación de la vacuna de ácidos nucleicos es la respuesta inmune limitada atribuida al material genético específico o diseñado, su reactogenicidad y la necesidad de adyuvante para una inmunidad a largo plazo (Badgujar et al., 2020).

Una vacuna basada en nanomateriales consiste en utilizar nanomateriales como vehículos del componente antigénico (Shim et al., 2010). La adsorción y la conjugación son las interacciones básicas asociadas entre el antígeno y las nanopartículas. A la fecha han sido empleados un conjunto de materiales para este fin, incluyendo nanopolímeros, liposomas, nanopartículas inorgánicas, nanomateriales a base de carbono y puntos cuánticos (Badgujar et al., 2020).

Las principales limitantes de las nanovacunas están dadas por su toxicidad celular, la estabilidad de los nanoconjugados y los aspectos regulatorios para su aprobación. Por tal razón es importante seguir investigando en este campo para superar dichos retos. Uno de los materiales más promisorios en este campo son las nanopartículas de oro, que constituyen una plataforma adecuada para la administración de fármacos, dado que pueden ser sintetizadas y funcionalizadas con relativa facilidad; además son biocompatibles y han mostrado tener efecto adyuvante (Salazar-González et al., 2015).

2.8. Nanopartículas de oro (AuNP)

El oro ha sido utilizado en la medicina moderna desde la década de 1920, como un tratamiento común para la tuberculosis y artritis reumatoide. Si bien la terapia con oro fue ineficaz para tratar la tuberculosis, fue muy exitosa en la reducción de la inflamación en la artritis (Hess et al., 2019). El oro ha tenido aplicaciones en tratamientos para cáncer y como agente antimicrobiano, típicamente en nanopartículas.

Las nanopartículas de oro pueden variar en tamaño de 1 nm a 100 nm y tienen una fuerte absorción óptica y dispersión de luz debido a la resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR) (Algar et al., 2011). Además, hay múltiples estudios donde es posible conjugar las AuNP con biomoléculas que produzcan una respuesta inmune.

2.9. Síntesis de nanopartículas de oro (AuNP)

La mayor parte de los métodos de síntesis de oro coloidal producen partículas cuyo diámetro varía desde 5 nm hasta 150 nm aproximadamente (Hermanson, 2013). El estado monodisperso ocurre por un balance entre las fuerzas que actúan sobre estas nanopartículas (Dykman & Khlebtsov, 2012). A causa de la naturaleza hidrofóbica de las AuNP; éstas tienden a agregarse en complejos mayores mediante fuerzas de van der Waals, en donde la agregación causa un cambio de un color naranja rojizo a rojo violeta o azul. Este puede ser medido con un espectrofotómetro por el cambio de absorbancia (Faz Hernández, 2023), debido a esto deben ser estabilizadas, por

ejemplo, con moléculas de citrato sobre su superficie, aportando cargas negativas que inducen fuerzas de repulsión entre las partículas.

Existen varios métodos para sintetizar AuNP, pero los más usados son el método de Turkevich y el método de Frens, y diversas variantes de éstos.

2.9.1. Método de Turkevich

El método Turkevich, si bien es el más antiguo de los métodos de síntesis, sigue siendo popular debido a su facilidad. Produce AuNP de 15 a 20 nm de una manera directa y reproducible. La síntesis ocurre en un medio acuoso, los iones citrato son mezclados con una solución de ácido cloroáurico (HAuCl_4) (**Figura 5**). Al calentar, ocurre el proceso de reducción, que es visible por un cambio de coloración en la solución inicial (convirtiéndose en una suspensión). El cambio de coloración sigue el orden: amarillo, incoloro, morado y rojo (**Figura 6**). Esto sucede porque los iones citrato son adicionados en exceso para acelerar la reacción de reducción y éstos se adsorben en la superficie de las AuNP producidas para la estabilización. Por lo tanto, este método genera AuNP con carga negativa (Farfán-Castro et al., 2023).

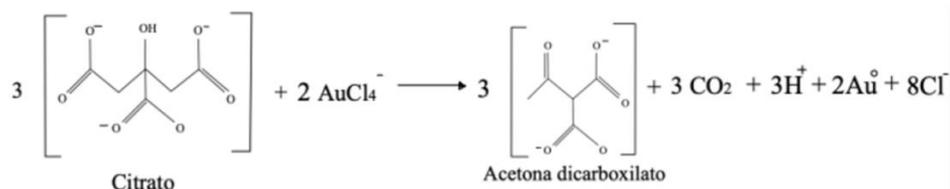


Figura 5. Reacción de síntesis de AuNP.

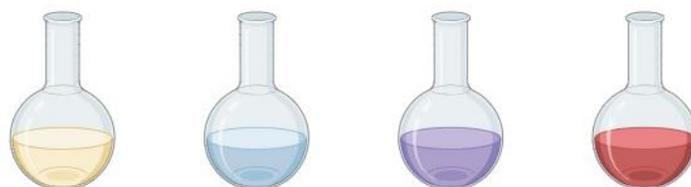


Figura 6. Cambio de coloración durante la síntesis.

2.9.2. Método de Frens

El método de Turkevich fue modificado posteriormente por Frens para producir AuNP de diferentes tamaños (Farfán-Castro et al., 2023). Está basado en un sistema acuoso donde la relación de volumen de una solución de H₂AuCl₄ con concentraciones decrecientes de citrato puede ser variada para cambiar el tamaño de las AuNP en un rango de 16 a 147 nm (Faz Hernández, 2023). Una relación menor estabiliza rápidamente las AuNP más pequeñas, mientras que la situación opuesta promueve la agregación de AuNP pequeñas en AuNP más grandes (Kimling et al., 2006). Al igual que con el método de Turkevich, el método de Frens produce AuNP con carga negativa estabilizadas electrostáticamente debido a los iones de citrato adsorbidos en la superficie.

2.10. Caracterización de las AuNP

Es posible caracterizar las nanopartículas de oro utilizando diferentes técnicas para determinar sus propiedades fisicoquímicas. Las más usadas son la espectrofotometría, dispersión de luz dinámica (DLS, *dynamic light scattering*) y microscopía electrónica de transmisión (TEM).

La espectrofotometría es una técnica para caracterizar la absorción de luz por las nanopartículas de oro principalmente en el espectro visible, lo que permite el cálculo de coeficientes de extinción. El análisis por DLS es útil para determinar la distribución hidrodinámica del tamaño, lo que permite asegurar que las nanopartículas sean homogéneas y medir su dispersidad. La visualización por TEM es adecuada para obtener imágenes de nanopartículas de oro para medir su tamaño y observar su morfología (Farfán-Castro et al., 2023).

2.10.1. Espectrofotometría

Las AuNP dispersas en un medio apropiado muestran coloraciones intensas debido a su resonancia plasmónica superficial localizada (LSPR). La LSPR de las AuNP es un fenómeno visual que resulta de la interacción entre la luz y los electrones de la superficie de las nanopartículas que tienen un tamaño menor que la longitud de onda

de la luz que las excita (L. Cheng et al., 2020). A medida que aumenta el tamaño de las AuNP, su señal LSPR tiende a desplazarse hacia el rojo y a ensancharse más. Las AuNP esféricas adecuadamente dispersas absorberán principalmente la región azul-verde del espectro electromagnético.

Teniendo en cuenta estos efectos, las suspensiones líquidas de AuNP esféricas con tamaños que van desde 5 a 50 nm serían observadas con tonalidades de color que abarcan desde rojo oscuro hasta el rojo claro.

2.10.2. Dispersión de Luz Dinámica

La dispersión de luz dinámica (DLS) es un método de caracterización básico de las nanopartículas de oro (AuNP) dado que la DLS mide aproximadamente 100 conteos por segundo, durante al menos 10 segundos, realizando un mínimo de 10 ejecuciones de medición por evento, lo cual proporciona numerosos resultados rápidos. Considerando un coloide monodisperso, el resultado mostrado será una distribución única del tamaño hidrodinámico en un gráfico de intensidad, incluyendo un índice de polidispersidad (PDI). El instrumento mide fluctuaciones dependientes del tiempo de la luz dispersada por las partículas en una suspensión que están permanentemente en movimiento browniano aleatorio. La intensidad de tales fluctuaciones es relacionada con el coeficiente de difusión de la ecuación de Einstein-Stokes para calcular el radio de una partícula esférica (Farfán-Castro et al., 2023). El tamaño obtenido es el diámetro hidrodinámico de la partícula, es decir, el tamaño de partículas suspendidas en agua rodeadas por una doble capa acuosa, por lo cual siempre será más grande el diámetro medido en DLS que en TEM.

2.10.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

En la microscopía electrónica de transmisión (TEM), un haz de electrones de alta energía (~200 keV) interactúa con una muestra transparente a los electrones (de ~100-150 nm de espesor) para estudiar la microestructura y la composición de las nanopartículas de oro (Sridhara Rao et al., 2010).

Las AuNP aparecen como objetos sólidos bidimensionales de material denso al observarles con un microscopio electrónico de transmisión. A medida que el haz de electrones incide en éstas, las nanopartículas de oro aparecen como marcadores oscuros e impenetrables debido a la luz transmitida por estas. Esta apariencia es debida a la alta densidad electrónica del oro, que causa la dispersión de electrones (Farfán-Castro et al., 2023).

2.11. Funcionalización de proteínas en AuNP (bioconjugación)

La adsorción de una molécula de proteína sobre la superficie de una nanopartícula de oro es referida como bioconjugación, y puede ser de forma física o química. En la metodología física o fisisorción, que ocurre al adicionar una proteína a una suspensión de nanopartículas de oro, la proteína puede adsorberse en la superficie de las AuNP mediante interacciones electrostáticas, hidrofóbicas, de van der Waals y de coordinación (Salazar-González et al., 2015).

Las proteínas son biomoléculas compuestas por cadenas de residuos de aminoácidos con grupos laterales que poseen cargas (ya sea positiva o negativa), no cargados (polares), hidrofóbicos o especiales (cisteína). En suspensión acuosa, las proteínas constituyen principalmente un electrolito coloidal anfótero (Farfán-Castro et al., 2023). En la fisisorción por interacción electrostática, el objetivo es favorecer que las proteínas cargadas positivamente interactúen con las nanopartículas de oro cargadas negativamente por estar estabilizadas con citrato.

Al agregar proteína en pequeñas cantidades a las AuNP las sensibilizarán hasta formar aglomerados, lo que provocará la agregación de estos conjugados. Dichos efectos serán influidos por el pH de la solución en donde la proteína resida. Por su parte la adición en exceso de proteína ayudará a las AuNP a estabilizarse y evitará la agregación (Farfán-Castro et al., 2023).

La interacción hidrofóbica comprende la adsorción de proteína en la superficie de la nanopartícula de oro que involucra las regiones hidrofóbicas en la superficie de la proteína. La adsorción de moléculas de proteína a la superficie de una nanopartícula de oro que involucra dipolos está contenida en las interacciones de van der Waals, y

este tipo de interacciones suele ser más complicadas de predecir. Las interacciones de coordinación, o enlaces dativos, consideran el establecimiento de un enlace de coordinación entre la molécula de proteína y la superficie de la nanopartícula de oro (**Figura 7**) (Salazar-González et al., 2015).

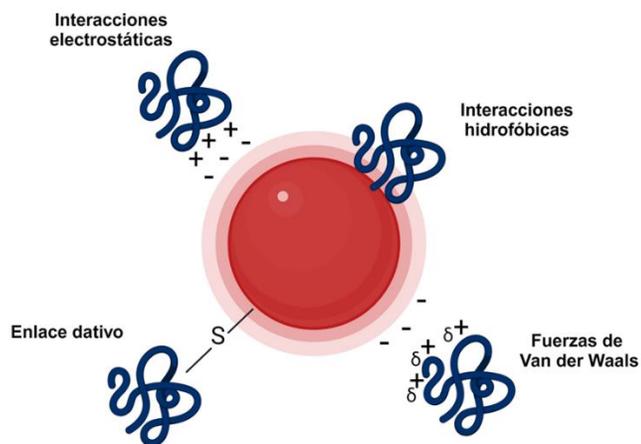


Figura 7. Unión de proteínas a nanopartículas de oro (AuNP) por fisisorción.

2.12. Factores importantes en la conjugación AuNP-proteína

El desarrollo de conjugados estables depende de varias interacciones, como fue descrito en la sección anterior. Adicionalmente estos factores deben ser considerados:

- el punto isoeléctrico (pI) de la proteína
- el pH de la solución para conjugación
- la cantidad añadida de proteína

En general, la adsorción máxima de proteínas ocurre cuando el pH está cerca o ligeramente por encima de su pI (Zhang et al., 2020). Otro factor relevante es determinar la cantidad mínima de proteína necesaria para conservar la estabilidad del conjugado frente a la agregación de las nanopartículas. Es posible monitorear la agregación por medio de espectrofotometría y por el cambio de color (**Figura 8**).

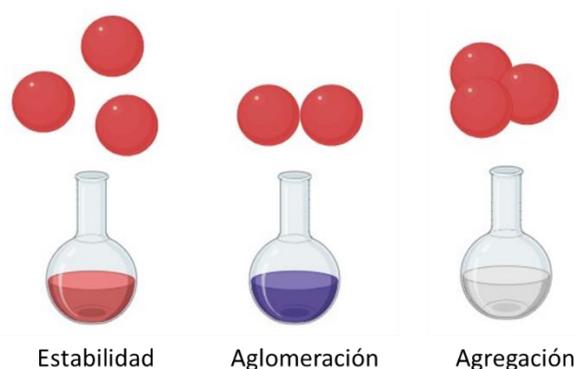


Figura 8. Cambios de coloraciones en los conjugados al ser estables, aglomerados y cuando presentan agregación.

2.13. Vacunas utilizando nanopartículas de oro

Durante los últimos años han sido publicados diversos estudios de vacunas que usan AuNP ya que tienen una toxicidad reducida y son aptas para la funcionalización con antígenos modelo (Farfán-Castro et al., 2023).

La mayoría de los estudios han obtenido respuestas inmunológicas, describiendo propuestas del mecanismo molecular para que las AuNP sean transportadoras de antígenos. Las AuNP son capturadas por las células dendríticas, para que posteriormente la internalización celular ocurra por fagocitosis, macropinocitosis y endocitosis mediada por receptores en las células dendríticas (Farfán-Castro et al., 2023).

Una vez internalizados, los antígenos son cargados en moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), las cuales son expresadas en la superficie celular, para ser presentados a los linfocitos (L. A. Dykman & Khlebtsov, 2017). En estos estudios concluyeron que los conjugados AuNP-antígeno aumentan el proceso de presentación de antígenos al promover la maduración efectiva de las células dendríticas y la proliferación de células Th y NK, logrando una mayor secreción de las citocinas IL-4, IFN γ , IL-12 e IL-10. No obstante, el tamaño de partícula, la funcionalización, el tipo de célula, la forma de las AuNP, la orientación del proceso (con/contra la gravedad) y la concentración son factores que influyen en la captación de AuNP por lo que el

mecanismo aún no es definitivo (L. A. Dykman & Khlebtsov, 2017; Farfán-Castro et al., 2021; Salazar-González et al., 2015).

Sanofi-Pasteur y GlaxoSmithKline (GSK) (VAT00002), Clover Biopharmaceuticals y GSK (SCB-2019), Nanogen Pharmaceuticals Biotechnology (Nanocovax) y el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas (MCV-COV1901) ya han desarrollado vacunas candidatas basadas en la proteína espícula (S) recombinante del SARS-CoV-2 (Wong-Arce et al., 2024). La mayoría de estos candidatos están en fases 2 y 3, y usan como adyuvante aluminio.

Hay estudios previos sobre el progreso de una vacuna basada en AuNP contra el coronavirus, pero es necesario optimizar la formulación ya que las respuestas inmunológicas deseadas aún no han sido obtenidas (Sanchez-Villamil et al., 2019).

Por otro lado, la construcción de proteínas quiméricas puede dar lugar a vacunas multiepitópicas capaces de inducir una respuesta inmunitaria centrada en aquellas dianas que resulten en la neutralización, mejorando la inmunogenicidad y la inmunidad de memoria (Wong-Arce et al., 2024).

Por estas razones, el considerar una vacuna basada en una proteína recombinante en donde el acarreador y posible adyuvante sea la nanopartícula de oro puede mejorar la inmunogenicidad de la vacuna, y provocar menores efectos secundarios que el adyuvante de aluminio usado comercialmente. Además de tener una plataforma como las AuNP que no solo sean para vacunas humanas, sino también para uso veterinario, como para una posible vacuna contra el PRRS.

3. JUSTIFICACIÓN

La sociedad desde sus inicios ha convivido con diversos microorganismos que han causado enfermedades tanto en humanos como en animales. El ejemplo más reciente fue la pandemia de COVID-19, la cual causó la muerte de 7 millones de personas alrededor del mundo. Esto demostró la importancia del desarrollo de candidatos vacunales que puedan dar respuesta a futuras pandemias en tiempos cortos.

Hoy en día existen distintas tecnologías para desarrollar vacunas, que incluyen aquellas basadas en virus atenuados, por ejemplo, las vacunas contra el sarampión y el rotavirus, o las vacunas basadas en virus inactivados, como la vacuna contra la poliomielitis. Durante las últimas décadas han sido desarrolladas más plataformas, de menor costo, seguras y de rápido desarrollo. Durante la pandemia de la COVID-19 hubo un récord en el tiempo de desarrollo, basándose en las plataformas de ARNm, adenovirus y virus inactivados. A pesar de estos logros, aún es necesario desarrollar candidatos vacunales con adyuvantes libres de patente, económicos y efectivos, que permitan usar dosis menores de los inmunógenos y que favorezcan la respuesta inmune deseada. Esto es relevante tanto para enfermedades que perjudican a seres humanos como para aquellas que impactan al ganado, provocando significativas pérdidas económicas anuales debido a la falta de vacunas contra los virus más prevalentes en el ganado.

El propósito de este proyecto es desarrollar una nanovacuna mediante la adsorción de proteínas recombinantes en nanopartículas de oro por medio de fisisorción, el cual es un método rápido y de bajo costo, como un esfuerzo para detonar el desarrollo de vacunas contra patógenos relevantes.

4. HIPÓTESIS

Encontrando condiciones específicas de pH, tiempo y concentración de proteína, es posible adsorber proteínas modelo y recombinantes sobre nanopartículas de oro para producir conjugados estables con concentraciones suficientes de antígenos como prototipos de nanovacunas que provoquen una respuesta inmune deseada.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Establecer condiciones de adsorción de proteínas antigénicas que permitan funcionalizar nanopartículas de oro, que sean estables y que tengan la cantidad necesaria de inmunógeno en la superficie para generar una formulación vacunal de prueba contra virus respiratorios.

5.2. Objetivos específicos

1. Preparar y caracterizar (por espectrofotometría visible, dispersión dinámica de luz y microscopía electrónica de transmisión) nanopartículas de oro de 20 y 40 nm.
2. Evaluar condiciones de adsorción (pH y concentración de proteína) de proteínas modelo (lisozima, α -quimotripsina, albúmina de suero bovino e inmunoglobulina G humana de plasma sanguíneo) obtener conjugados estables.
3. Cuantificar directa (por electroforesis en gel de poliacridamida) e indirectamente (por espectrofotometría UV) la concentración de proteína adsorbida en nanopartículas de oro.
4. Obtener una cinética de adsorción de una proteína modelo similar a una proteína recombinante de interés para caracterizar parámetros de adsorción.
5. Evaluar las condiciones anteriores para producir conjugados estables con dos proteínas recombinantes y cuantificar si contienen concentraciones suficientes de éstas para considerarles prototipos de nanovacuna.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

La parte experimental fue realizada en el Laboratorio de Bioseparaciones de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

6.1. Síntesis de nanopartículas de oro (AuNP)

Los equipos empleados para la síntesis de AuNP fueron una placa de calentamiento MS-H280-Pro (DLAB Scientific, Beijing, China) y un recirculador de agua fría (LabTech, Namyangju, Corea). Para la caracterización de las suspensiones obtenidas fue empleado un espectrofotómetro Genesys 50 (Thermo Fisher, Waltham, MA), durante la evaluación de cambios de absorbancia de AuNP sintetizadas y de conjugados de AuNP-proteína, y un Zetasizer Advance Pro (Malvern Panalytical, Malvern, UK) para la medición de diámetros hidrodinámicos. Los reactivos utilizados fueron citrato de sodio tribásico dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y ácido cloroáurico trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), ambos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), y agua de un sistema Milli-Q (Millipore, Burlington, MA).

La síntesis de nanopartículas de oro (AuNP) fue usando el método de Turkevich modificado por Frens en 1973, como muestra la **Figura 9**. Utilizando agua de un sistema Milli-Q, fueron preparadas soluciones de 1 % $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ y 1 % HAuCl_4 un día antes de la síntesis. La mezcla de reacción fue de 1 mL de HAuCl_4 y 1.3 y 0.5 mL de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ para partículas de 20 y 40 nm, respectivamente. Cada una de las mezclas fue agitada constantemente, dejando reposar por 5 min. En 100 mL de agua en ebullición fue incorporada la mezcla de precursores con agitación continua por 15 min en calentamiento. La concentración final de HAuCl_4 fue de 0.01 % para ambos lotes de AuNP y de 0.013 % y 0.005 % de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ para el lote de 20 y 40 nm, respectivamente. Las suspensiones obtenidas permanecieron en reflujo 30 min adicionales, y posteriormente fueron almacenadas a 4 °C.

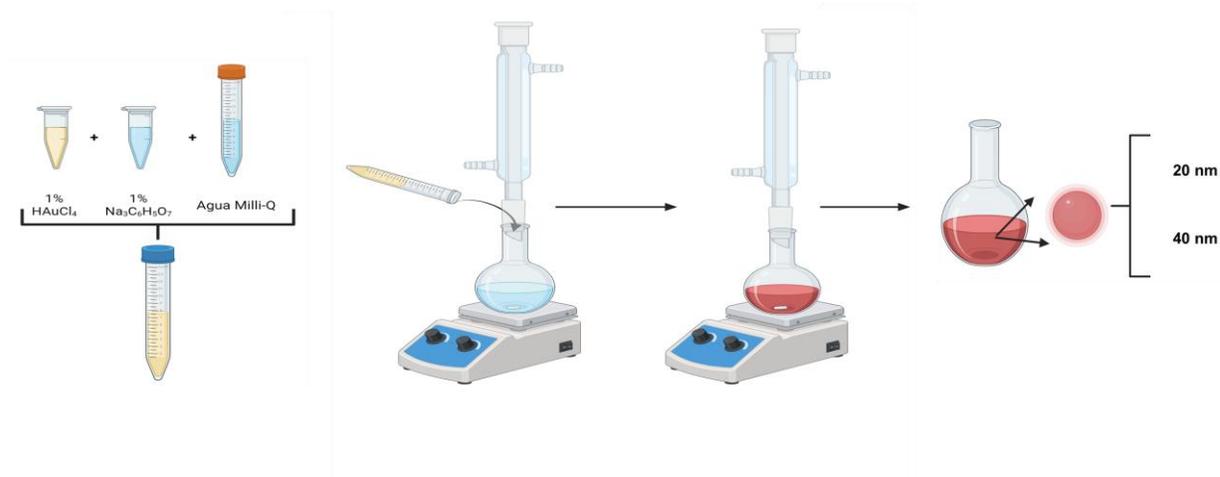


Figura 9. Síntesis de AuNP usando el método Turkevich-Frens modificado.

6.2. Conjugados AuNP-proteínas modelo y estudio de adsorción

Los equipos empleados para la preparación de los conjugados fueron un Vortex Genie-2 (Scientific Industries, Bohemia, NY), una microcentrífuga Prism C2500 (Labnet International, Edison, NJ), un sonicador de inmersión 1510 (Branson, Danbury, CT) y el espectrofotómetro Genesys 50 (Thermo Fisher Scientific) para cuantificación indirecta. La cuantificación directa fue por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato (SDS-PAGE) con el equipo Mini-Protean® Tetra System (Bio-Rad, Hercules, CA)

En el estudio de adsorción de proteínas en AuNP fueron utilizadas cuatro proteínas modelo: lisozima (Lyz), α -quimotripsina (CMT), albúmina de suero bovino (BSA) e Inmunoglobulina G humana de plasma sanguíneo (IgGH), todas de Sigma-Aldrich. Como surfactante fue empleado polisorbato 20 (Tween 20) y para los lavados una solución amortiguadora de fosfato salino (PBS) 1x que contiene cloruro de sodio (NaCl) 137 mM, cloruro de potasio (KCl) 2.7 mM, fosfato disódico (Na_2HPO_4) 10 mM y fosfato monopotásico (KH_2PO_4) 1.8 mM. En la técnica SDS-PAGE los reactivos fueron agua desionizada, acrilamida (Bio-Rad, 161-0101), bis-acrilamida (Sigma-Aldrich, 146072), Trizma® Base (Sigma-Aldrich, T1503), dodecilsulfato sódico (Sigma-Aldrich,

L3771), tetrametiletenodiamina (TEMED) (Sigma-Aldrich, T7024) y persulfato de amonio (APS) (Sigma-Aldrich, A3678).

Para la elaboración de 200 μL de conjugado AuNP-proteína modelo 100 μL de suspensión de AuNP concentrada 2x, 2 μL de polisorbato 20 (1%) y 100 μL de proteína (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) fueron combinados para obtener un conjugado con una concentración final de 0.01 % de polisorbato 20 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína modelo, dejando reaccionar durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente el conjugado fue centrifugado 3 min a 8100 \times g para aquellos conjugados con AuNP de 40 nm y por 15 min para las AuNP de 20 nm. El sobrenadante fue recuperado para su posterior medición y reemplazado con PBS 1x con 0.01 % de polisorbato 20 (**Figura 10**).

Para la cuantificación directa de los conjugados fue empleada la técnica SDS-PAGE, y mediante el programa ImageJ fue determinado el valor de proteína adsorbida en cada conjugado.

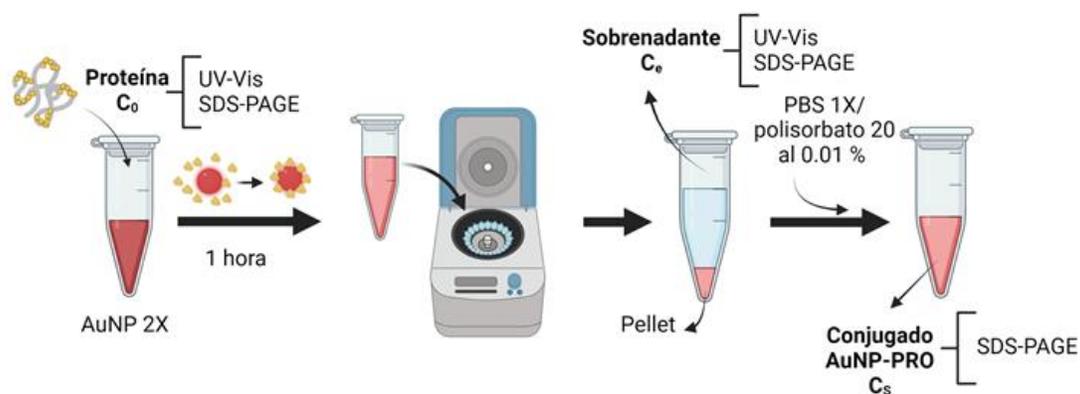


Figura 10. Metodología general para la preparación de conjugados AuNP-Proteína.

6.2.1. Evaluación del efecto del pH en la adsorción de proteína en AuNP

La evaluación del impacto del pH en la adsorción de proteínas modelo en AuNP fue en un rango de 6 a 11 empleando dos soluciones amortiguadoras, una de fosfato 20 mM que contiene Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4 , y otra de carbonato 20mM con Na_2CO_3 y

NaHCO₃, las cuales fueron ajustados con HCl y NaOH para obtener valores de pH 6, 7 y 8 con fosfato y 9, 10, 11 con carbonato.

Para la elaboración de 200 µL de conjugado AuNP-proteína modelo 100 µL de suspensión de AuNP concentrada 2x, con 2 µL de polisorbato 20 (1%) fueron centrifugados a 10,000 × g por 5 min las de 40 nm y por 20 min las de 20 nm. El sobrenadante fue remplazado con 100 µL de solución amortiguadora de interés. Seguido fueron agregados 100 µL de proteína modelo resuspendida en el buffer (200 µg/mL), dejando reaccionar durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente el conjugado fue centrifugado a 8100 × g por 3 min para aquellos conjugados con AuNP de 40 nm y por 15 min para las AuNP de 20 nm. El sobrenadante fue recuperado para su posterior medición y reemplazado con PBS 1x con 0.01 % de polisorbato 20.

6.2.2. Cinética de adsorción

A partir de un concentrado de 500 µg/mL de CMT fueron preparados 6 conjugados AuNP-CMT, en donde a 970 µL de AuNP 1x de 20 nm fueron adicionados 48.5 µL de 1 % de polisorbato 20, para conseguir una concentración final de 0.05 % de estabilizante, para añadir 30 µL del concentrado de CMT. Los conjugados estuvieron a temperatura ambiente y con agitación constante. El proceso de reacción fue detenido a distintos tiempos (0, 5, 10, 15, 60 y 120 min), centrifugando 20 min a 19,500 × g. Después, el sobrenadante fue recolectado para determinar la concentración de CMT remanente con el espectrofotómetro Genesys 50 a una longitud de onda de 280 nm.

6.3. Conjugados AuNP-proteínas recombinantes

Para la preparación de los conjugados AuNP-proteína recombinante fueron usadas dos proteínas, la LTB-p50 y la LTB-PRRSV proporcionadas por el Laboratorio de Biofármacos recombinantes en el Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina (CICSaB).

6.3.1. Conjugado AuNP-LTB-p50

Para la preparación de 200 µL de conjugados AuNP-LTB-p50 fueron usados 100 µL de suspensión de AuNP concentrada 2 x y ajustada a un pH 8 con 100 mM CO₃²⁻ y 2 µL de polisorbato 20 (1 %) para que el conjugado tuviera una concentración final de

0.01 % de polisorbato 20. Después fueron adicionados 100 μ L de LTB-p50 (200 μ g/mL), la cual previamente fue dializada durante 24 h en una solución amortiguadora de carbonato 20 mM, pH 8, dejando reaccionar durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente el conjugado fue centrifugado a 8100 \times g por 15 min para las AuNP de 20 nm. El sobrenadante fue recuperado para su posterior medición y reemplazado con PBS 1x con 0.01 % de polisorbato 20.

6.3.2. Conjugado AuNP-LTB-PRRSV

Para la preparación de 200 μ L de los conjugados AuNP-LTB-PRRSV fueron empleados 100 μ L de suspensión de AuNP concentrada 2x añadiendo 2 μ L de polisorbato 20 (1%) para que el conjugado tuviera una concentración final de 0.01 % de polisorbato 20. Después fueron incorporados 100 μ L de PRRSV (400 μ g/mL), la cual previamente fue dializada durante 24 h en una solución amortiguadora de fosfato 20 mM, pH 9.5, dejando reaccionar durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente el conjugado fue centrifugado a 8100 \times g por 15 min para las AuNP de 20 nm. El sobrenadante fue recuperado para su posterior medición y reemplazado con agua desionizada.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Síntesis de Nanopartículas de oro (AuNP)

Cuatro lotes de AuNP fueron sintetizados, 2 lotes de 20 nm y 2 lotes de 40 nm, para la preparación de conjugados por fisisorción. La síntesis de AuNP de dos tamaños fue para comparar la adsorción de proteínas modelo y recombinantes. Diversos estudios reportan resultados favorables para inmunización al usar AuNP esféricas con diámetros entre 15 y 50 nm según Dykman, L. A. (2020).

El tamaño y, en algunas aplicaciones, el nivel de agregación de las AuNP son clave para monitorear cambios debido a sus propiedades químicas, ópticas y biológicas (Iqbal et al., 2016). De éstos, el espectro de absorción es una forma rápida para caracterizar estas propiedades. En el primer lote fueron obtenidas nanopartículas con absorbancia máxima en longitudes de onda de 517 nm para las de 20 nm y 529 nm para las de 40 nm (**Figura 11a**). En el segundo lote para las AuNP de 20 nm la señal característica fue en 520 nm y para las de 40 nm fue en 523 nm (**Figura 12a**). Para ambos lotes, esto corresponde a la señal del plasmón de resonancia de AuNP dado que cuando la luz incide sobre las AuNP éstas absorben principalmente luz verde y transmiten luz roja, color característico de las partículas preparadas (Zhang et al., 2020).

Para ambos lotes hubo cambios en la señal máxima dependiendo del tamaño de las AuNP sintetizadas, en el caso de las de mayor tamaño existe un desplazamiento a la derecha, lo que es congruente con lo reportado (Huang & El-Sayed, 2010).

Mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) fue determinado el tamaño de las AuNP, en donde el movimiento browniano de las partículas en suspensión es medido para estimar su diámetro hidrodinámico (d_H), relativo al coeficiente de difusión traslacional (Hinterwirth et al., 2013). En el primer lote los diámetros promedios fueron de 27.92 nm y 44.72 nm. En el segundo fueron obtenidas AuNP de 34.56 nm y 48.50 nm (**Figura 11b**). Estos cambios son resultantes de factores como la viscosidad de la solución, la temperatura y la fuerza iónica, los cuales van a tener efecto en los diámetros medidos (Hinterwirth et al., 2013). Los índices de polidispersidad (PDI) menores a 0.3 indican

partículas más monodispersas y homogéneas. En contraste, el lote con un Pdl de 0.47 mostró indicios de que al momento de la síntesis factores externos como la temperatura o el tiempo de reacción afectaron la uniformidad de las nanopartículas. **(Figura 12b)** (Zabetakis et al., 2012).

Al tener estos tamaños distintos, es factible hacer una comparación en los resultados de las conjugaciones con las proteínas modelo y las recombinantes.

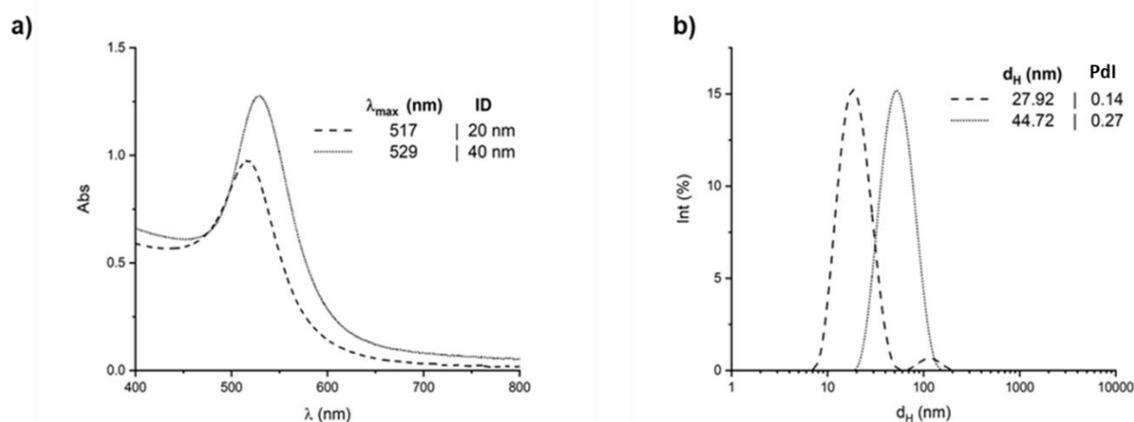


Figura 11. Caracterización de AuNP del lote 1 de 20 y 40 nm. **a)** Espectros de UV-Vis de AuNP en suspensión señalando la absorbancia máxima (λ_{max}). **b)** Diámetros hidrodinámicos (d_H) e índice de polidispersidad (Pdl).

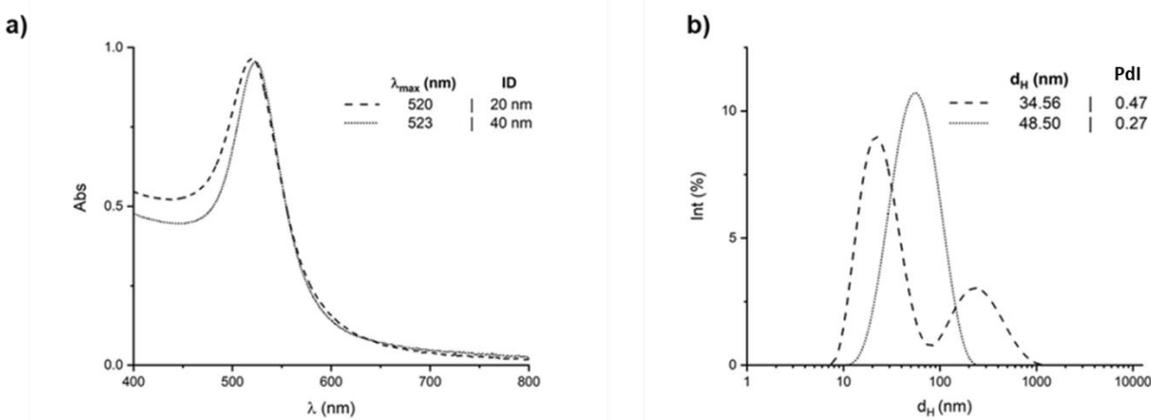


Figura 12. Caracterización de AuNP del lote 2 de 20 y 40 nm. **a)** Espectros de UV-Vis de AuNP en suspensión señalando la absorbancia máxima (λ_{max}). **b)** Diámetros hidrodinámicos (d_H) e índice de polidispersidad (Pdl).

En la medición realizada por microscopía electrónica de transmisión (TEM) fue observada la morfología de los lotes sintetizados, en donde la forma predominante fue la esférica. Al medir los diámetros de las AuNP del lote 2, fue obtenido un diámetro de 14.8 ± 2.8 nm para las AuNP identificadas como de 20 nm, por lo cual si hay una diferencia con el diámetro hidrodinámico obtenido de 34.56 nm. Al ser de menor tamaño es posible estudiar el impacto que tiene un tamaño más pequeño en la conjugación con proteínas modelo y recombinantes. Con las AuNP sintetizadas para obtener un tamaño de 40 nm el diámetro fue de 35.6 ± 4.6 nm, lo que es muy cercano al tamaño deseado, y no tan alejado del diámetro hidrodinámico (**Figura 13**).

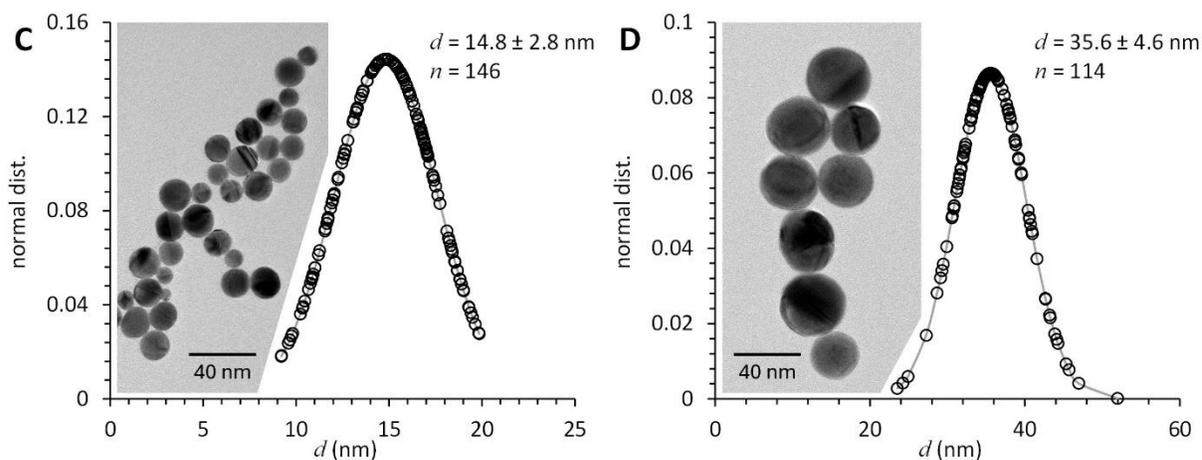


Figura 13. Caracterización de AuNP por medio de TEM del lote 2 mostrando AuNP esféricas. **C)** AuNP identificadas como de 20 nm, contabilizando un total de 146 nanopartículas. **D)** AuNP identificadas como de 40 nm, contabilizando un total de 114 nanopartículas.

7.2. Conjugados AuNP-Proteína y estudio de adsorción

Una vez caracterizadas las AuNP, y tras confirmar tamaños y propiedades objetivo, lo siguiente fue la preparación de distintos conjugados con proteínas modelo modificando factores como pH y concentración de proteína. El propósito fue encontrar condiciones para adsorber una mayor cantidad de proteína en las AuNP y obtener conjugados estables con la finalidad de ser candidatos vacunales.

La preparación de conjugados con proteínas modelo disponibles en el laboratorio fue para establecer las condiciones de fisisorción previo a utilizar la proteína recombinante, la cual no estaba disponible en grandes cantidades, además de que su tiempo de obtención es prolongado.

En un principio los conjugados fueron hechos con lisozima debido a la abundancia de ésta, además de que es una proteína altamente estudiada. La lisozima es una pequeña proteína globular monomérica de 14.6 kDa, con un punto isoeléctrico (pI) cercano a 11 (Yang et al., 2007).

Como una primera prueba fueron exploradas distintas concentraciones de lisozima para analizar la estabilidad del conjugado y la cantidad adsorbida de proteína en las AuNP. El rango de concentraciones iniciales de proteína fue propuesto de 56 a 900 $\mu\text{g/mL}$ en una solución amortiguadora de Tris. Los conjugados con AuNP de 20 nm se aglomeraron formando conjugados de color violeta, lo cual modificó su espectro UV-Vis (**Figura 14a**).

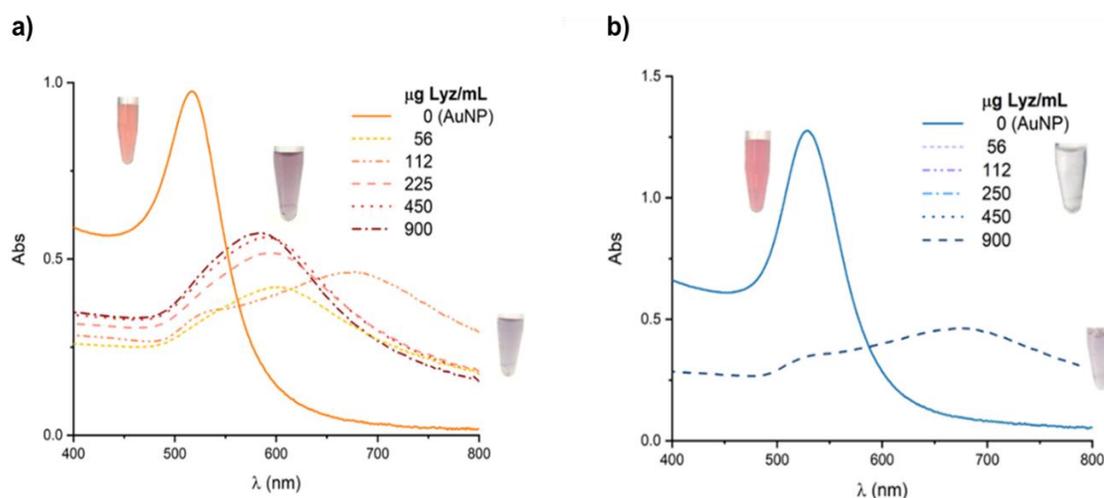


Figura 14. Espectro de 400 a 800 nm del conjugado AuNP-Lyz. Lisozima (Lyz) en Tris 20 mM, pH 8. Conjugado resuspendido en PBS 1x con 0.01 % de polisorbato 20. **a)** Conjugado con AuNP de 20 nm. **b)** Conjugado con AuNP de 40 nm.

En contraste, los conjugados de 40 nm colapsaron, tornándose transparentes e imposibilitando la medición de espectros de absorción, excepto en la concentración

más alta de proteína que provocó la aglomeración de las nanopartículas, pero no su agregación (**Figura 14b**). De acuerdo con los espectros y las coloraciones de los conjugados la decisión fue aumentar la concentración de lisozima, puesto que está reportado que es necesario tener proteína en exceso para favorecer la adsorción y estabilidad del conjugado (Hermanson, 2013).

Al aumentar la concentración de proteína adicionada a las nanopartículas al doble y triple de la concentración más alta probada en un comienzo los espectros comenzaron a mostrar una señal del plasmón de resonancia más parecido a una suspensión de AuNP sin proteína. La estabilidad de los conjugados preparados con las nanopartículas de 20 nm (**Figura 15a**) fue mejor en contraste con los conjugados preparados con AuNP de 40 nm que aún presentaban aglomerados (**Figura 15b**).

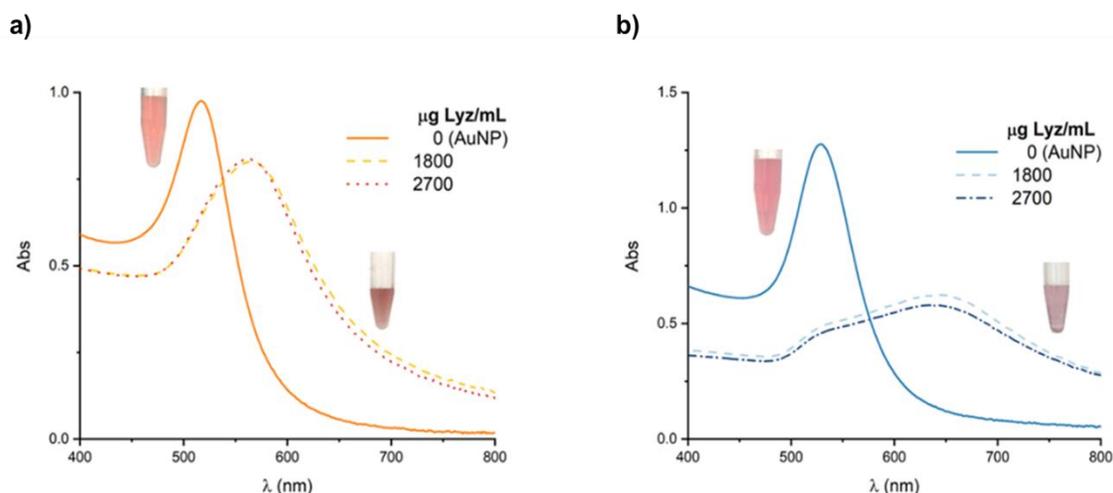


Figura 15. Espectro del conjugado AuNP con lisozima en solución amortiguadora de Tris 20 mM, pH 8. Conjugado resuspendido en PBS 1x con 0.01 % de polisorbato 20. **a)** Conjugado con AuNP de 20 nm. **b)** Conjugado con AuNP de 40 nm.

Con estos resultados es necesario agregar un exceso de proteína. En la misma relevancia, un aspecto importante al momento de la conjugación es el punto isoeléctrico (pI) de la proteína. Como fue mencionado en antecedentes, en la fisisorción las interacciones electrostáticas son importantes para que una proteína sea adsorbida en la superficie de las AuNP (Hermanson, 2013). En este caso, las AuNP

tienen una carga negativa y para lograr este tipo de interacción la proteína debe estar cargada positivamente. Si la proteína tiene un pI de 11, la solución amortiguadora requerida para cargarla positivamente debería tener un pH menor al pI . Así, la preparación de lisozima en 10 % de sacarosa con 0.01 % de polisorbato 20 modificando su pH original de 6 a 9, permitió acercarle más a su punto isoeléctrico sin perder su carga positiva. De igual manera, la adición de un equivalente a 50 monocapas de proteína es aproximada a una concentración inicial de 100 $\mu\text{g/mL}$ en el conjugado.

Con las condiciones anteriormente mencionadas mejora tanto la estabilidad como la cantidad de proteína adsorbida en las AuNP de 20 nm (**Figura 16a**). El aumento de la absorbancia máxima en la señal del plasmón de resonancia de las AuNP de 20 nm, pasando de 517 nm a 523 nm, y el cambio en el ancho de la señal indica la modificación de las AuNP debido a la adsorción de proteína en las nanopartículas (Faz Hernández, 2023). Por su parte, en las AuNP de 40 nm, aunque mejoraron su espectro respecto a menores concentraciones, hubo un desplazamiento importante hacia la derecha, de 529 nm a 537 nm, y su cambio en anchura fue más pronunciado por la posible presencia de aglomerados en los conjugados (**Figura 16b**).

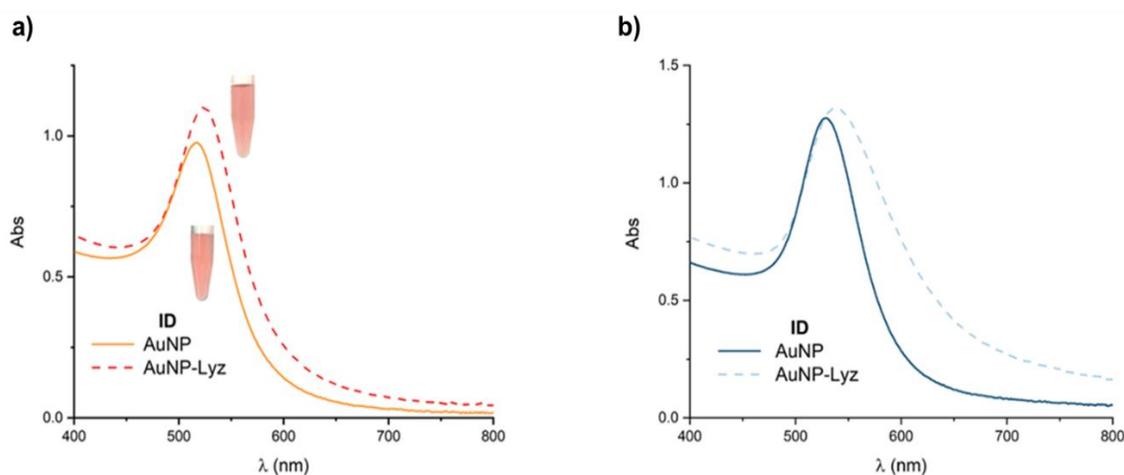


Figura 16. Espectro del conjugado AuNP-Lyz. AuNP con 0.01 % de polisorbato 20. Lisozima en solución de 10 % de sacarosa con 0.01 % de polisorbato 20, pH 9. 100 $\mu\text{g/ml}$ de proteína añadida. Conjugado resuspendido en PBS 1x con polisorbato 0.01 % de 20. **a)** Conjugado con AuNP de 20 nm. **b)** Conjugado con AuNP de 40 nm.

7.2.1. Conjugado AuNP-LTB-p50

Una vez que fue viable producir conjugados más estables con AuNP de 20 nm al adicionar una mayor cantidad de proteína y cerca de su punto isoeléctrico, lo siguiente fue realizar conjugados con la proteína recombinante de interés. LTB-p50 tiene un peso molecular de 25981.96 Da y un pI teórico entre 7-8, por lo cual fue disuelta en una solución de 10 % de sacarosa con 0.01 % de polisorbato, ajustando el pH a 8 con una solución amortiguadora de carbonato (CO_3^{2-} pH 10, 100 mM). Las AuNP 2x fueron ajustadas a pH 8, lo cual acercaba al punto isoeléctrico de la proteína. Para este caso, fueron probadas 30 y 50 monocapas de LTB-p50 que equivalen a una concentración en el conjugado de 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para corroborar tanto la estabilidad del conjugado como la adsorción de la proteína en las AuNP. La **Figura 17** muestra conjugados concentrados 5x, después de lavar con PBS 1x y con un volumen final de 40 μL en lugar de los 200 μL iniciales, esto con la finalidad de observar en SDS-PAGE la cantidad adsorbida de proteína del conjugado.

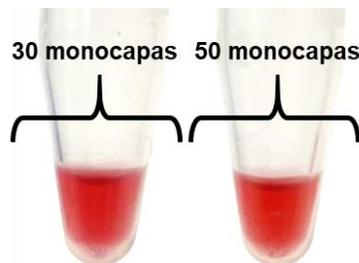


Figura 17. Estabilidad de los conjugados AuNP-LTB-p50 con 30 y 50 monocapas.

Una vez confirmada la estabilidad del conjugado, la proteína adsorbida fue cuantificada mediante SDS-PAGE, analizando muestras de los conjugados y los sobrenadantes, relativo a una línea de calibración de BSA. La **Figura 18** muestra que al usar 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (30 monocapas) se adsorbió un total de 31.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (50 monocapas) fueron 77.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En un futuro al inmunizar con esta concentración de proteína adsorbida en las nanopartículas sería suficiente para obtener una respuesta inmunológica (Salazar-González et al., 2015). Como fue mencionado en un principio, la cantidad de proteína recombinante es limitada dado su costo de producción, además

de que su producción es prolongada y su replegamiento dependerá en gran medida de las soluciones amortiguadoras; así, es necesario usar la menor cantidad de proteína recombinante. Con este propósito fue hecho un estudio detallado sobre el efecto del pH en la adsorción de proteínas modelo en las AuNP para lograr disminuir el número de monocapas de proteína recombinante encontrando las condiciones apropiadas.

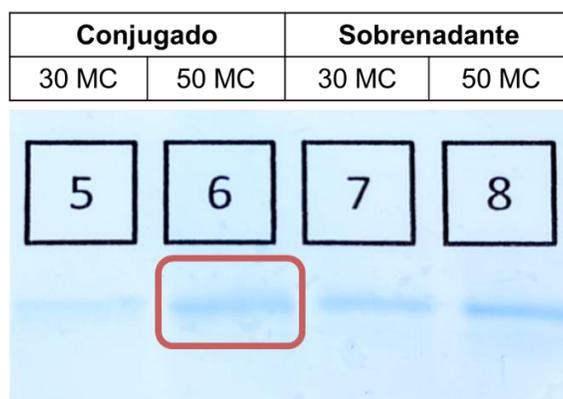


Figura 18. SDS-PAGE del conjugado AuNP-LTB-p50 con AuNP de 20 nm. AuNP con 0.01 % de polisorbato 20. LTB-p50 en 10 % de Sacarosa con 0.01 % de polisorbato 20, pH 8. Conjugado resuspendido en PBS 1 × con 0.01 % de polisorbato 20. Concentrado 5 veces.

7.3. Evaluación del efecto del pH y el polisorbato en la adsorción de proteínas modelo en AuNP

Para la estabilidad de los conjugados por fisisorción hay diferentes parámetros que deben de ser considerados: el punto isoeléctrico (pI) de la proteína, el pH de la conjugación y la cantidad adicionada de proteína (Geoghegan, 1988). Como fue visto anteriormente es importante la cantidad de proteína adicionada a las nanopartículas y es clave para evitar agregados de las nanopartículas con la finalidad de obtener un conjugado que sea apto como candidato vacunal.

7.3.1. Conjugados de AuNP con lisozima (Lyz)

El pH de la conjugación va a depender directamente del pI de la proteína. Hay referencias que mencionan que la adsorción máxima de proteína ocurre cuando el pH de conjugación está cerca del pI (Zhang et al., 2020). Tomando en cuenta las interacciones electrostáticas, en principio una molécula de proteína cargada

positivamente va a adherirse a una superficie cargada negativamente; en este caso a una nanopartícula de oro, debido a los citratos de su superficie (Salazar-González et al., 2015). Debido a esto con las cuatro proteínas modelo fue estudiada la estabilidad y adsorción de cada una en los distintos tamaños de nanopartículas. La **Figura 19** muestra únicamente los espectros de los conjugados con AuNP de 20 nm debido a que los conjugados con AuNP de 40 nm se agregaron dejando conjugados totalmente transparentes. Los conjugados con nanopartículas de 20 nm presentaron agregaciones en aquellos sin incluir polisorbato 20 para la conjugación. Al adicionar polisorbato 20 fue notable que en el pH más cercano al pI es en donde el conjugado más estable. Además, hay que considerar que el peso molecular de la lisozima es pequeño, 14.6 kDa, lo que no garantiza el recubrimiento de las nanopartículas permitiendo que entre ellas interactúen y se agreguen. Medidos por DLS, **Figura 20**, los tamaños de los conjugados con las nanopartículas de 20 nm con 0.01 % de polisorbato 20 fueron superiores a 600 nm y con Pdl mayores a 0.3, lo que indica una polidispersidad grande y conjugados poco homogéneos, indicando que las AuNP se agregaron y no es posible su separación. Debido a esta prueba la decisión fue usar polisorbato 20 en los conjugados a realizar, además ya está reportado que estabiliza a los conjugados de nanopartículas de oro (Hormozi-Nezhad et al., 2013).

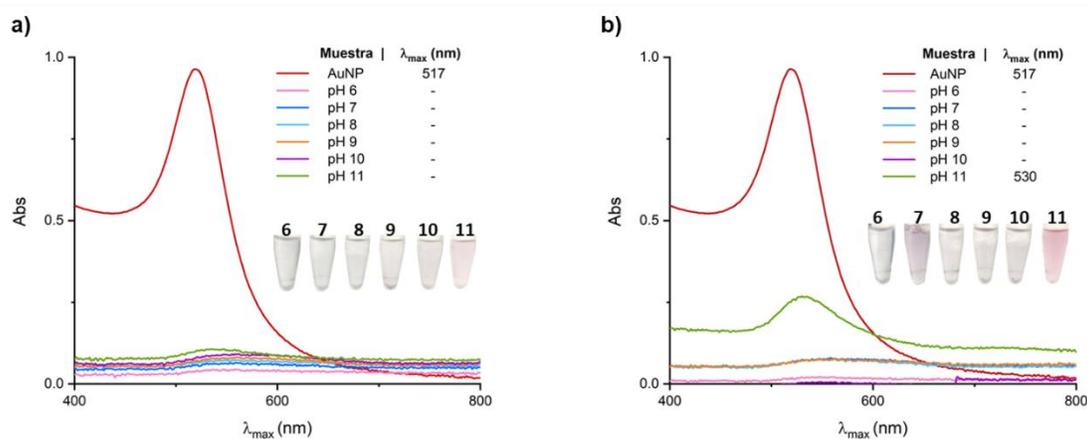


Figura 19. Efecto del pH y el polisorbato en los conjugados de AuNP de 20 nm con lisozima. Espectro visible de conjugados hechos en fosfato 20 mM, pH 6 a 8, y en carbonato 20 mM, pH 9 a 11, sin polisorbato 20 (a) o adicionando 0.01 % de este (b).

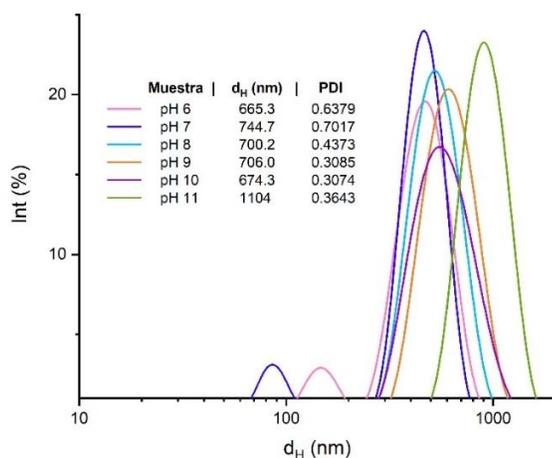


Figura 20. Diámetros hidrodinámicos (d_H) e índice de polidispersidad (PDI) de los conjugados de lisozima en AuNP de 20 nm con 0.01 % de polisorbato 20.

7.3.2. Conjugados de AuNP con quimotripsina (CMT)

La siguiente proteína modelo para preparar conjugados fue α -quimotripsina (CMT), la cual tiene un peso molecular de 25 kDa y un punto isoeléctrico de 8.75. La consideración fue que al ser de mayor tamaño que la lisozima, daría una mayor protección a las nanopartículas y los conjugados no formarían agregados, o al menos disminuiría la aglomeración.

Al realizar los conjugados con las nanopartículas de 20 nm; éstos presentaron una mayor estabilidad que los conjugados realizados con lisozima al no mostrar coloraciones violetas, manteniendo un color rojizo. Además, su espectro mostró un comportamiento muy similar al de las nanopartículas solas, con un desplazamiento a la derecha lo que señala que la proteína sí modifica la superficie de la AuNP (**Figura 21a**). En este caso, la quimotripsina fue suficiente para ofrecer protección a las nanopartículas de 20 nm y evitar que entre ellas se aglomeren. La adición de polisorbato ayuda a que no se aglomeren las AuNP y evita que las proteínas se peguen a las paredes del tubo, lo cual es un punto importante, ya que puede quedar adherida proteína a la pared y no sería tomada en cuenta. Los conjugados de 40 nm siguieron mostrando un color violeta, con espectros desplazados a la derecha y con absorbancia

disminuida (**Figura 21b**), significando que no son estables y forman aglomerados, por lo que no tienen un comportamiento deseado para un candidato vacunal.

El diámetro hidrodinámico disminuyó considerablemente, comparado con los conjugados con lisozima, pero los valores de Pdl para ambos tamaños de nanopartículas mantuvieron un valor elevado, lo que indica que los conjugados son polidispersos (**Figura 22**), llegando a tener conjugados de micras por lo cual no es posible garantizar que sean buenos candidatos vacunales, ya que el objetivo son valores de Pdl iguales o menores a 0.2, dado que significa menor polidispersidad. Por lo visto en los ensayos anteriores, las aglomeraciones impiden significativamente la correcta adsorción de proteínas.

Dada la similitud de quimotripsina con la proteína de interés, LTB-p50, fue empleado SDS-PAGE para cuantificar en qué pH había una mayor adsorción de proteína. Los conjugados hechos con AuNP de 20 nm, incluyendo 0.01 % de polisorbato 20, resultaron con una mayor adsorción de proteína con pH de conjugación entre 7 y 8 (**Figura 23**), llegando a adsorber 33.79 $\mu\text{g/ml}$ en el pH 8, lo que sigue con la idea de una mayor adsorción de proteína cuando el conjugado está cercano al punto isoeléctrico de la proteína. En el punto isoeléctrico la proteína tiene una carga neta de cero, lo que significaría una menor repulsión electrostática entre las mismas moléculas de proteína al momento de adsorberse en la superficie de las AuNP. Además, las proteínas presentan una mayor cantidad de regiones expuestas de residuos hidrofóbicos, lo que posibilita la interacción con las superficies hidrofóbicas de las AuNP. Pero algo a resaltar es que la adsorción es mayor al acercarnos al punto isoeléctrico en un pH en donde la proteína tiene una carga positiva, lo cual favorece las interacciones electrostáticas con las nanopartículas de oro que poseen carga negativa (Salazar-González et al., 2015).

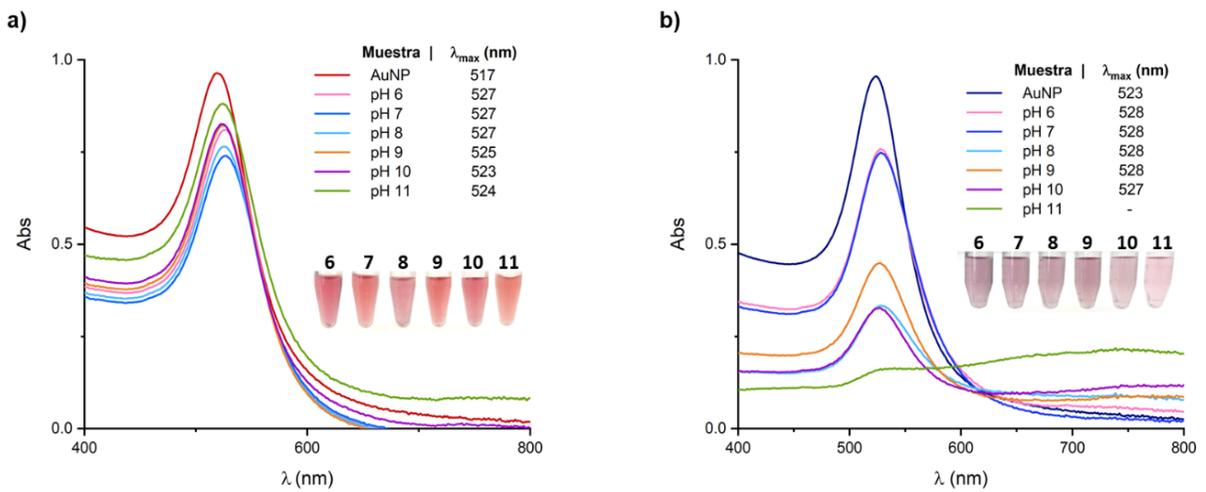


Figura 21. Efecto del pH de conjugación en la adsorción de quimotripsina en AuNP, incluyendo polisorbato 20. Espectro visible de conjugados hechos en fosfato 20 mM, pH 6 a 8, y en carbonato 20 mM, pH 9 a 11, con AuNP de 20 nm **(a)** y de 40 nm **(b)**.

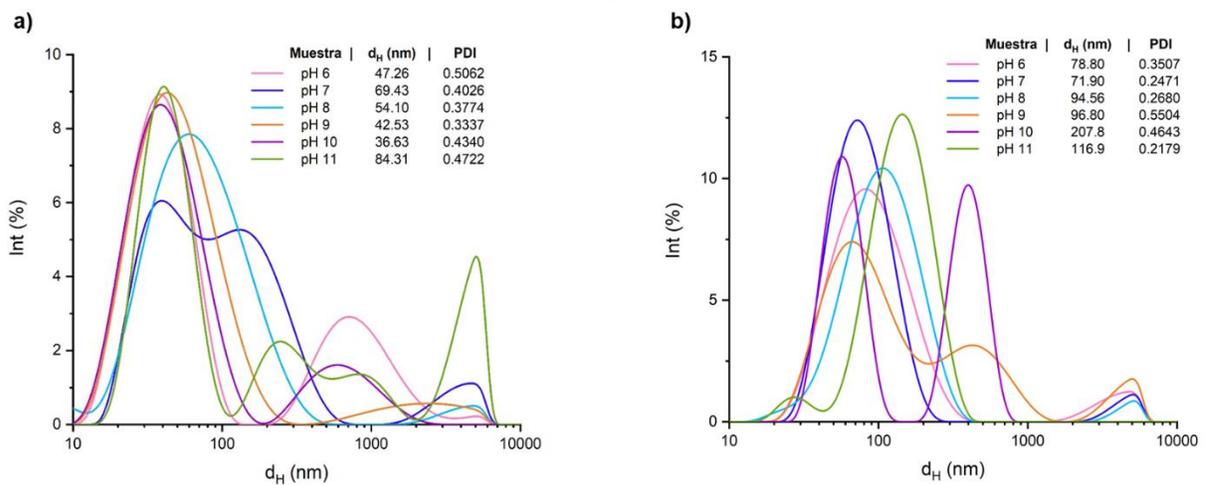


Figura 22. Diámetros hidrodinámicos (d_H) e índice de polidispersidad (PDI) de los conjugados de quimotripsina con AuNP de 20 nm **(a)** y de 40 nm **(b)** resuspendidos en PBS 1x con 0.01 % de polisorbato 20.

pH	6	7	8	9	10	11
Concentración adsorbida ($\mu\text{g/ml}$)	22.80	29.87	33.79	24.74	15.70	15.04

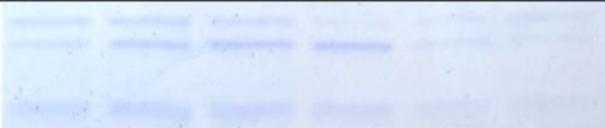


Figura 23. Gel SDS-PAGE del conjugado AuNP-CMT con AuNP de 20 nm y 0.01 % de polisorbato 20.

7.3.3. Conjugados de AuNP con albúmina de suero bovino (BSA)

Para demostrar que una proteína más grande influye en la estabilidad de los conjugados, evitando su agregación, fueron probadas proteínas de mayor peso molecular. Esto comenzó con albúmina de suero bovino (BSA), de 66 kDa y un pI entre 5.1 y 5.5, lo cual es más del doble de la CMT. Los conjugados de AuNP-BSA fueron elaborados de la misma manera que con lisozima y quimotripsina. Al medir el espectro UV-Vis los conjugados hechos con AuNP de 20 nm (**Figura 24a**) mostraron una absorbancia similar a las AuNP sin conjugar, con un ligero desplazamiento a la derecha. Haciendo la conjugación en soluciones con pH de 7, 8 y 9 la presencia de agregados fue notable en longitudes de onda entre 550 y 700 nm, lo cual podría estar relacionado con la carga negativa que tendría la proteína en estos valores pH, lo que en teoría evitaría su adsorción con las NP. Por otro lado, los espectros de los conjugados con las nanopartículas de 40 nm presentaron aglomerados más intensos en pH 10 y 8 (**Figura 24b**), lo cual puede ser por la misma razón que con las de 20 nm. No obstante, son partículas más grandes y la posibilidad de que la proteína proteja la superficie de la nanopartícula disminuye.

Al medir el diámetro hidrodinámico de AuNP-BSA partiendo con AuNP de 20 nm, los valores no sobrepasaban los 55 nm, pero los índices de polidispersidad eran mayores a 0.4 (**Figura 25a**). Esto significa que hay conjugados de diversos tamaños, en parte por emplear AuNP de 20 nm con un Pdl de 0.47, lo que dificultaría obtener conjugados homogéneos y sin tanta variabilidad en su tamaño. Los conjugados AuNP-BSA con

AuNP de 40 nm (**Figura 25b**) tuvieron un tamaño menor a 100 nm y Pdl menores a 0.4, pero no tuvieron estabilidad, ya que se tornaron de color violeta al ser lavados con PBS, lo que demuestra que tanto el d_H , el Pdl y la estabilidad son elementos clave para obtener un conjugado con la finalidad buscada.

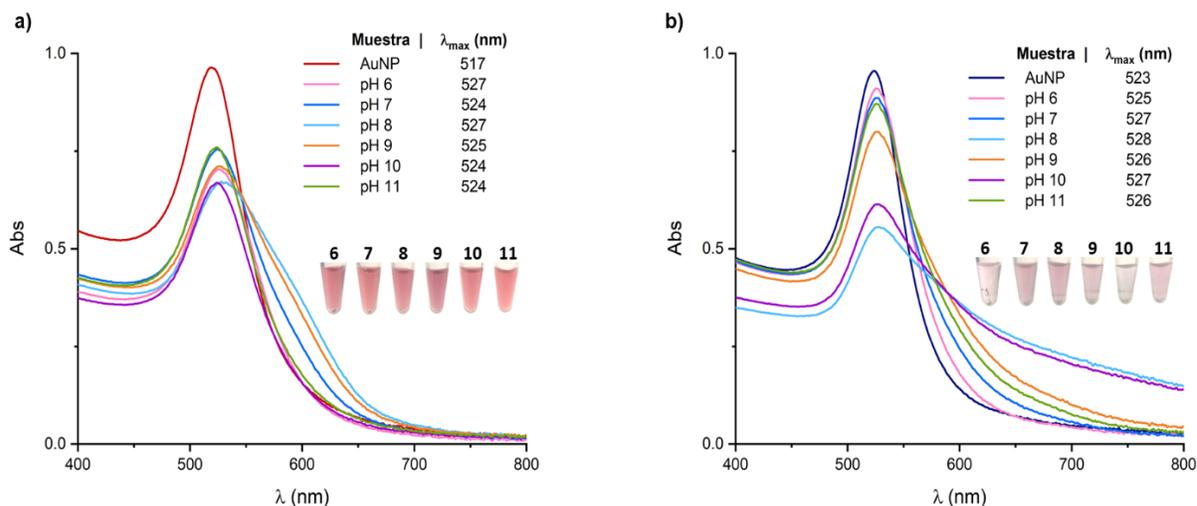


Figura 24. Efecto del pH de conjugación en la adsorción de BSA en AuNP, incluyendo polisorbato 20. Espectro visible de conjugados hechos en fosfato 20 mM, pH 6 a 8, y en carbonato 20 mM, pH 9 a 11, con AuNP de 20 nm (a) y de 40 nm (b).

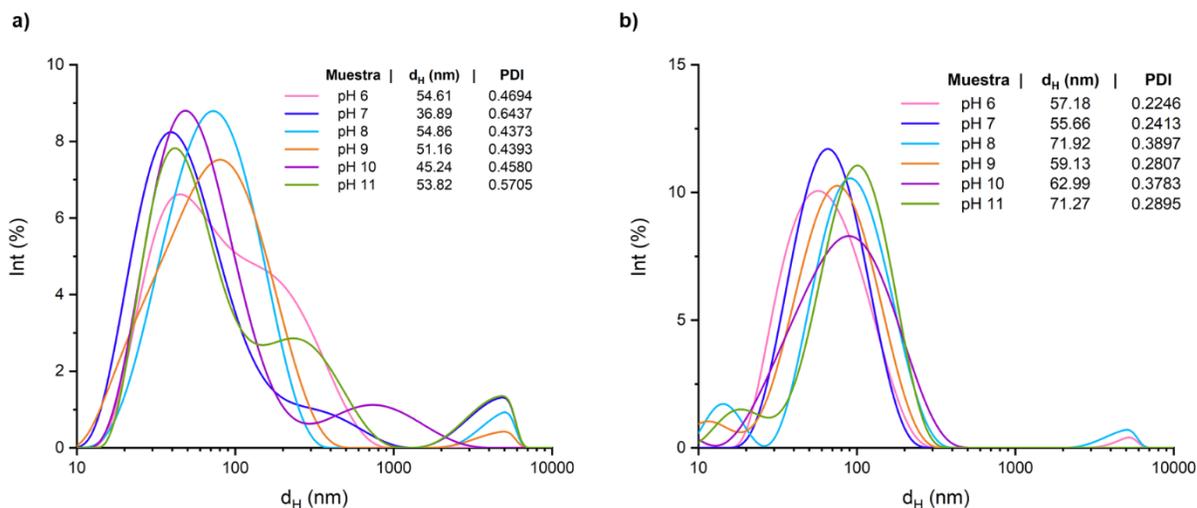


Figura 25. Diámetros hidrodinámicos (d_H) e índice de polidispersidad (Pdl) de los conjugados de BSA en AuNP de 20 nm (a) y de 40 nm (b) resuspendidos en PBS 1x con 0.01 % de polisorbato 20.

7.3.4. Conjugados de AuNP con inmunoglobulina humana (IgGH)

La última proteína modelo probada fue inmunoglobulina G humana (IgGH) de plasma sanguíneo, siendo la más grande en el estudio del impacto del pH en la conjugación. IgGH tiene un peso molecular de 150 kDa, lo cual es más del doble que BSA, para demostrar que el tamaño de la proteína impacta en la estabilidad del conjugado. Todos los conjugados fueron estables resultando con color rojizo, y espectros con una forma muy similar a las NP sin conjugar, además de que no había aglomerados (**Figura 26a**). El desplazamiento a la derecha de la absorbancia máxima indica que sí hay una modificación en la superficie de las nanopartículas. Los conjugados con AuNP de 40 nm fueron los primeros conjugados de este tamaño que mostraron un comportamiento estable, y los espectros fueron muy similares a las nanopartículas sin conjugar, afirmando que el tamaño de la proteína sí impacta en la estabilidad de los conjugados (**Figura 26b**).

Los resultados obtenidos del análisis por DLS siguen indicando que el Pdl de los conjugados realizados con nanopartículas de 20 nm son altos debido al Pdl de la síntesis de las nanopartículas (**Figura 27a**). En los conjugados de 40 nm hay una menor polidispersidad obteniendo valores menores a 0.25 y los tamaños no sobrepasan los 100 nm (**Figura 27b**). Este hecho indica que sí es necesaria una protección a las nanopartículas para obtener conjugados de menor tamaño y Pdl bajo. El tamaño de la proteína impacta tanto en la estabilidad como en los tamaños y Pdl de los conjugados, debido a que la proteína es un polímero, y de comparar la fisisorción con la quimisorción, la proteína tendría el papel de este polímero protector como lo es el polietilenglicol (PEG) que proporciona una excelente estabilización estérica de las nanopartículas, por tanto, si la molécula estabilizadora es pequeña la probabilidad de choque entre nanopartículas es mayor, a tener una molécula de gran tamaño que impida estas agregaciones entre las nanopartículas (Farfán-Castro et al., 2023).

Con estos ensayos probando soluciones amortiguadoras con un rango de pH de 6 a 11 para la conjugación de cuatro proteínas modelo con los dos distintos lotes de AuNP, fue obtenida más información acerca de la adsorción de las proteínas en la superficie

de las AuNP. El uso de polisorbato 20 es necesario para la estabilidad de los conjugados. Las AuNP de 20 nm muestran mayor estabilidad aún con proteínas de bajo peso molecular, lo cual las hizo más aptas para seguir con los ensayos con las proteínas de interés. La mayor adsorción ocurrió en los valores de pH cercanos a los pl de las proteínas, y no en el pH en donde serían positivas y favorecerían las interacciones electrostáticas.

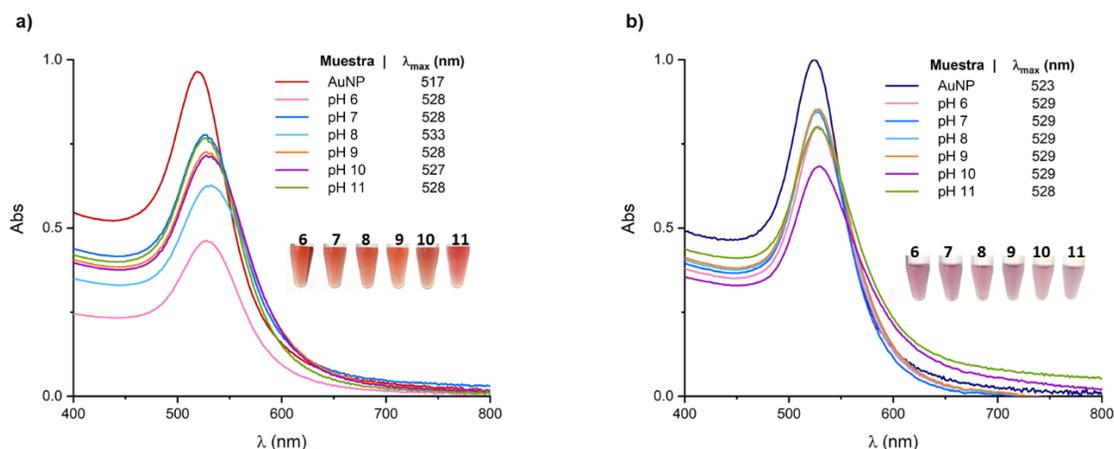


Figura 26. Efecto del pH de conjugación en la adsorción de IgGH en AuNP, incluyendo polisorbato 20. Espectro visible de conjugados hechos en fosfato 20 mM, pH 6 a 8, y en carbonato 20 mM, pH 9 a 11, con AuNP de 20 nm (a) y de 40 nm (b).

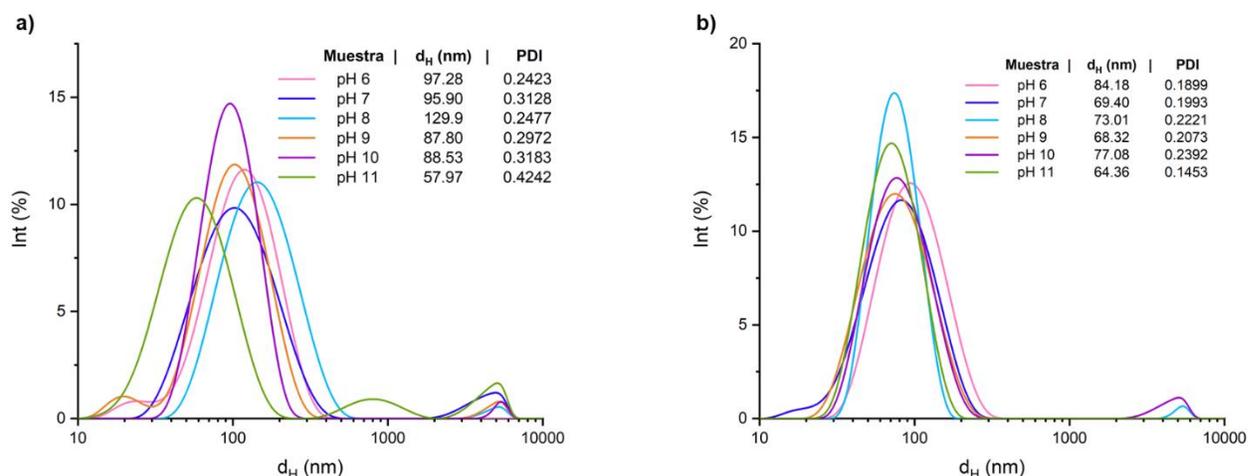


Figura 27. Diámetros hidrodinámicos (d_H) e índice de polidispersidad (PDI) de los conjugados de IgGH en AuNP de 20 nm (a) y de 40 nm (b) resuspendidos en PBS 1x con 0.01 % de polisorbato 20.

Así, en este trabajo fue relevante que las interacciones hidrofóbicas, así como enlaces dativos y fuerzas de van der Waals son responsables en gran medida de la adsorción de la proteína en las NP.

Un punto importante es la síntesis de las nanopartículas de oro, debido a que impacta directamente en la conjugación la polidispersión, por lo que sería adecuado el realizar varias síntesis y seleccionar aquellas con menor Pdl, para obtener conjugados con menores valores de polidispersión y más homogéneos.

7.4. Cálculo de monocapas de proteína sobre AuNP

Para el cálculo de la concentración de proteína adherida sobre una nanopartícula de oro (1 monocapa) fue necesario partir de la concentración de AuNP (1x) que es igual a 50 µg/mL. A partir de esta concentración es posible conocer el número total de AuNP por mL, ya sean las AuNP de 20 o 40 nm. Con este dato conocido, lo siguiente fue calcular el área superficial de una nanopartícula de oro y el d_H de cada proteína modelo usada en los ensayos. Considerando las proteínas con un arreglo globular, y colocando de forma compacta sobre el área superficial de una nanopartícula (en 2D) fue posible calcular el número de proteínas que tiene una sola nanopartícula de oro. Al relacionar el número de proteínas en una nanopartícula de oro con el número de nanopartículas de oro que hay en un mL de solución, es factible obtener el número de proteína que hay por mL de solución de nanopartículas de oro, y con este dato ya es posible convertir a concentración de proteína que hay por mL de solución (**Tabla 1**).

Tabla 1. Características de las proteínas modelo, diámetro hidrodinámico (d_H) y número de monocapas calculados para su fisisorción sobre nanopartículas de oro (AuNP, 1x) de 20 y 40 nm.

Características de las proteínas modelo					Conc. para formar una monocapa	
ID	Proteína	Peso molecular (kDa)	Punto isoeléctrico (pI)	d_H (nm)	AuNP ₂₀ (µg/mL)	AuNP ₄₀ (µg/mL)
Lyz	Lisozima	14.3	11.35	3.2	2.08	1.04
CMT	α -quimotripsina	25	8.75	3.86	2.50	1.25
BSA	Albúmina de suero bovino	66.43	4.8	5.34	3.46	1.73
IgG	Inmunoglobulina G	150	6.9	7.01	4.54	2.27

7.5. Cinética de adsorción

Para caracterizar el proceso de fisisorción por medio de una cinética fue empleada α -quimotripsina, dado que era la más similar en peso molecular y con pI cercano a la proteína de interés. Además, para garantizar la estabilidad del conjugado fue utilizada una mayor cantidad de polisorbato 20 en el conjugado, 0.05 %. El ensayo fue realizado durante 2 h a temperatura ambiente y con AuNP de 20 nm, tomando muestras a distintos tiempos para medirlas por medio de espectrofotometría. De acuerdo con los datos obtenidos el conjugado AuNP-CMT llega a un equilibrio en 15 min, sugiriendo una cinética rápida en donde el proceso que controla la velocidad de adsorción del sistema es la adsorción de la proteína sobre la superficie de la AuNP.

Los datos experimentales obtenidos fueron ajustados a un modelo cinético de pseudo primer orden, postulado originalmente por Lagergren (Moussout et al., 2018). La velocidad de adsorción relativa al equilibrio es:

$$\frac{dq}{dt} = k(q_e - q), q(0) = 0$$

Resolviendo la ecuación, resulta:

$$q = q_e(1 - e^{-kt})$$

Donde q ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) es el soluto adsorbido (CMT) en el adsorbente (AuNP) en función del tiempo, q_e ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) el soluto adsorbido en el adsorbente en el equilibrio, k (1/min) es la velocidad específica de adsorción y t (min) es el tiempo. Al resolver la ecuación diferencial y ajustando el modelo con los valores experimentales, resultaron $k = 0.449 \text{ min}^{-1}$ y $q_e = 0.296 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ (**Figura 28**).

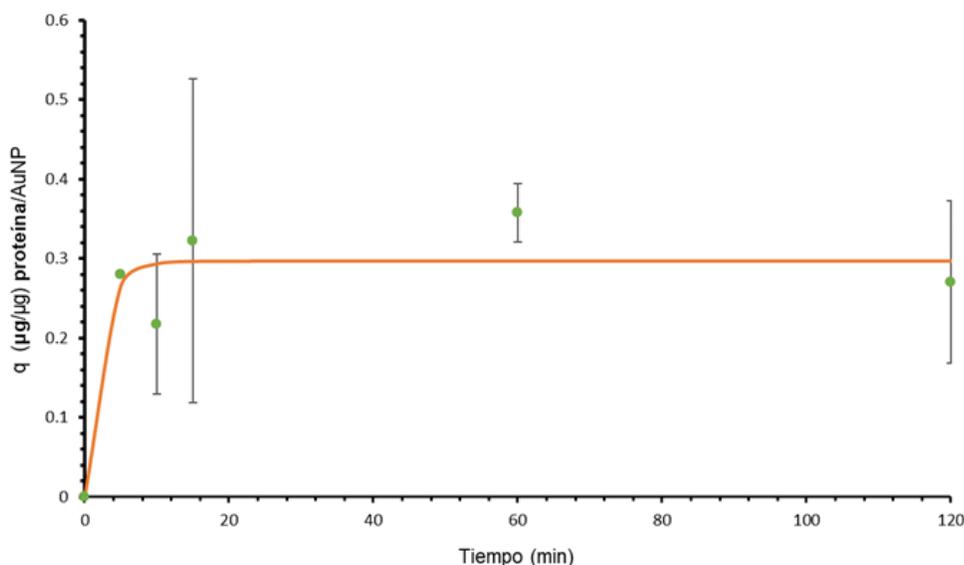


Figura 28. Cinética de adsorción de α -quimotripsina (CMT) sobre AuNP de 20 nm con 0.05 % de polisorbato 20. La proteína adsorbida en las AuNP fue de $0.296 \mu\text{g}/\mu\text{g}$, equivalente a una concentración de $14.8 \mu\text{g}/\text{mL}$.

El tiempo de adsorción de α -quimotripsina fue de 2.22 min, lo cual indica que la fisisorción ocurre en un tiempo muy rápido. En un estudio previo con inmunoglobulina G humana de plasma sanguíneo esta tuvo un tiempo de adsorción de 4.8 min (Faz

Hernández, 2023). Esto indica que para una proteína más pequeña el tiempo de adsorción también es más pequeño, que para aquellas que tienen un mayor peso molecular. La proteína adsorbida en las AuNP fue de 0.296 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$, equivalente a una concentración de 14.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Este ensayo corrobora que la fisisorción es un mecanismo muy rápido, y faltaría realizar cinéticas con proteínas de mayor y menor tamaño para realmente comprobar que el tamaño de las proteínas tienen un impacto directo en el tiempo de adsorción.

7.6. Conjugado AuNP-LTB-PRRSV

La producción de proteínas recombinantes solubles con fines farmacéuticos requiere la capacidad de expresar y purificar proteínas recombinantes en distintas plataformas, como en *E. coli*. No obstante, aún existen problemas para su producción, como lo son la expresión escasa del gen de interés y el plegamiento incorrecto de la proteína expresada en agregados insolubles llamados cuerpos de inclusión (Papanepoytou & Kontopidis, 2014).

Estos aspectos clave determinan el uso de la proteína recombinante, y contrario a lo esperado en la última producción de la proteína de interés (LTB-p50), no fue posible obtener la concentración necesaria para emplearla en los conjugados. Así, fue empleada la proteína recombinante LTB-PRRSV, que igualmente es producida en el Laboratorio de Farmacéuticos Recombinantés y aunque sus características son distintas a la LTB-p50 fue útil para explorar las condiciones de adsorción de proteínas recombinantes sobre AuNP con el propósito de lograr un candidato vacunal.

Para la conjugación de LTB-PRRSV, originalmente en una solución de 10 % sacarosa con 0.01 % polisorbato 20; ésta fue solubilizada por microdiálisis en Tris pH 9.5 y 8.75, donde no mostró precipitados (**Figura 29**).

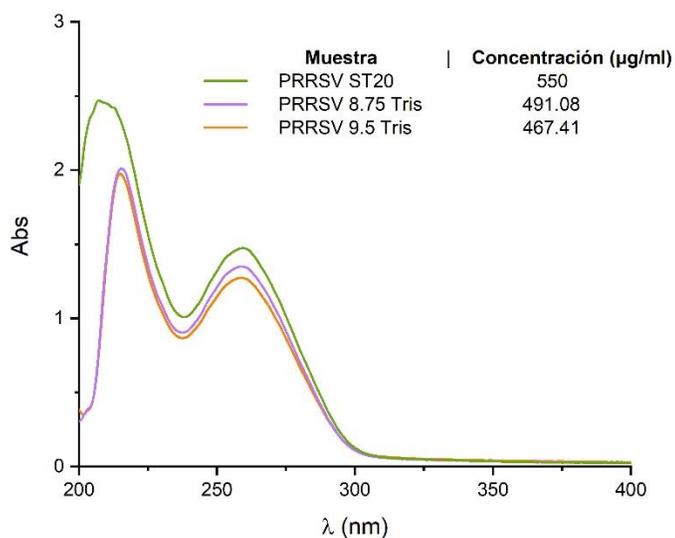


Figura 29. Espectro de 200 a 400 nm de la proteína PRRSV antes y después de diálisis.

Al dializar la proteína hubo una disminución en la concentración de la proteína, esto debido al volumen incrementado durante la diálisis, pero sin observar precipitados que es algo no deseado al preparar el conjugado.

Los conjugados fueron preparados con dos tamaños de AuNP, y al momento de medir directamente la proteína adsorbida (**Figura 30**), los mejores resultados fueron obtenidos con los conjugados de 20 nm en un pH de 9.5. La adsorción de LTB-PRRSV sobre las AuNP fue de 141.47 µg/mL en la muestra concentrada 5 veces, lo cual sería suficiente para considerarlo como candidato vacunal. Por su parte en un pH de 8.75 la proteína adsorbida fue de 96.4 µg/mL. Esta información corrobora más la propuesta de que no solo las cargas influyen en la adsorción de proteína en las AuNP, si no que las fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas tienen también un papel importante. Acorde a lo reportado, las interacciones hidrofóbicas constituyen uno de los tipos más significativos de interacciones no específicas en los sistemas biológicos (Sánchez-Iglesias et al., 2012). Por esta razón, aun cuando no hay control directo sobre este tipo de interacciones se fomenta el que no se formen precipitados y la estabilidad del precipitado.

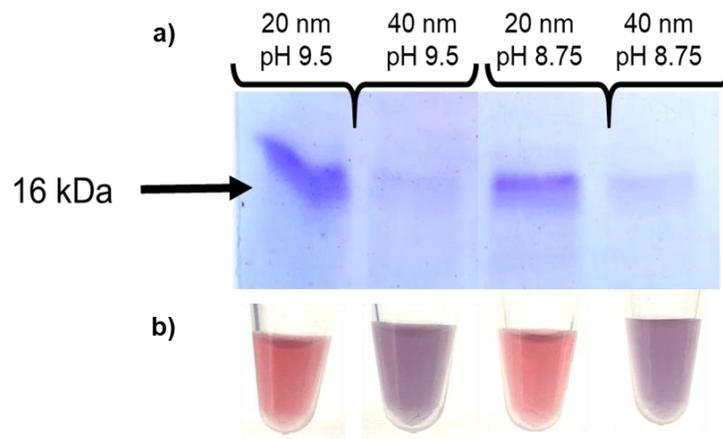


Figura 30. a) Análisis por SDS-PAGE de los conjugados preparados con las AuNP de 20 y 40 nm en valores de pH de 8.75 y 9.5. **b)** Estabilidad de los conjugados concentrados 5 veces y con lavados en agua desionizada.

8. CONCLUSIONES

Dos lotes de nanopartículas de oro esféricas fueron sintetizados, y al caracterizarlos por dispersión dinámica de luz (DLS) resultaron un primer lote con diámetros hidrodinámicos de 27.92 y 44.72 nm y el segundo lote de 34.56 y 48.50 nm. Por medio de microscopía electrónica de transmisión (TEM) la forma esférica de AuNP fue corroborada, con tamaños para el lote 2 de 14.8 ± 2.8 nm para las AuNP identificadas como de 20 nm y de 35.6 ± 4.6 nm para las identificadas como de 40 nm.

Distintas condiciones de adsorción fueron evaluadas con proteínas modelo, las cuales fueron lisozima, α -quimotripsina, albúmina de suero bovino e inmunoglobulina G humana de plasma sanguíneo. Mediante los primeros ensayos la conclusión que es necesario contar con un exceso de proteína para mantener conjugados estables. Además de que la presencia de polisorbato 20 es vital para la estabilidad de los conjugados.

Los ensayos para analizar la estabilidad y adsorción de proteínas modelos sobre AuNP con distintos valores de pH demostraron que el tamaño de la proteína brinda una protección estérica. La preparación de conjugados con proteínas de mayor peso molecular evita la formación de aglomerados/agregados. Además, las nanopartículas de oro de un tamaño promedio de 20 nm proporcionan conjugados con mayor estabilidad, pero son necesarios valores de Pdl bajos para obtener conjugados más homogéneos. Por lo cual es necesario realizar diferentes síntesis de AuNP y elegir aquella con un menor Pdl para evitar conjugados polidispersos y poco homogéneos.

Una cinética de adsorción fue obtenida con una proteína modelo similar a una proteína recombinante de interés. Las condiciones de adsorción fueron a una concentración inicial de 0.015 mg/mL, en un volumen de 970 μ L de AuNP de 20 nm con una concentración de polisorbato de 0.05% en el conjugado, realizando el ensayo sin agitación. De acuerdo con los datos obtenidos el conjugado AuNP-CMT llega a un equilibrio en 15 min.

La conjugación realizada a un pH cercano al punto isoeléctrico de la proteína favorece la adsorción sobre las nanopartículas de oro. Al analizar la cantidad adsorbida de

proteína en el conjugado por electroforesis en gel de poliacridamida, fue obtenida una concentración mayor de proteína en valores de pH próximos al pI de las proteínas, logrando adsorber hasta 77 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LTB-p50 y 141.47 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LTB-PRRSV lo que sería suficiente para un candidato vacunal. Aún falta evaluar más condiciones para disminuir la cantidad de proteína añadida inicialmente.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad Nafees, Plorde James J., & Drew W. Lawrence. (2011). *Microbiología Médica*. McGraw Hill.
- Algar, W. R., Prasuhn, D. E., Stewart, M. H., Jennings, T. L., Blanco-Canosa, J. B., Dawson, P. E., & Medintz, I. L. (2011). The Controlled Display of Biomolecules on Nanoparticles: A Challenge Suited to Bioorthogonal Chemistry. *Bioconjugate Chemistry*, 22(5), 825-858. <https://doi.org/10.1021/bc200065z>
- Badgujar, K. C., Badgujar, V. C., & Badgujar, S. B. (2020). Vaccine development against coronavirus (2003 to present): An overview, recent advances, current scenario, opportunities and challenges. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, 14(5), 1361–1376. <https://doi.org/10.1021/bc200065z>
- Bouard, D., Alazard-Dany, N., & Cosset, F. L. (2009). Viral vectors: From virology to transgene expression. In *British Journal of Pharmacology*, 157(2), 153-165. <https://doi.org/10.1021/bc200065z>
- Calvo Fernández, E., & Zhu, L. Y. (2021). Racing to immunity: Journey to a COVID-19 vaccine and lessons for the future. In *British Journal of Clinical Pharmacology*, 87(9), 3408-3424. <https://doi.org/10.1021/bc200065z>
- Díaz-Chiguer, D. L., Tirado-Mendoza, R., Márquez-Navarro, A., Ambrosio-Hernández, J. R., Ruiz-Fraga, I., Aguilar-Vargas, R. E., Lira-Martínez, J. M., & López-Valdés, J. C. (2019). Detección y caracterización molecular de virus respiratorios causantes de infección respiratoria aguda en población adulta. *Gaceta Médica de Mexico*, 155, 16-21. <https://doi.org/10.1021/bc200065z>
- Dykman, L. A., & Khlebtsov, N. G. (2017). Immunological properties of gold nanoparticles. In *Chemical Science*, 8(3), 1719-1735. <https://doi.org/10.1039/C6SC03631G>
- Dykman, L., & Khlebtsov, N. (2012). Gold nanoparticles in biomedical applications: Recent advances and perspectives. *Chemical Society Reviews*, 41(6), 2256–2282. <https://doi.org/10.1039/C1CS15166E>
- Farfán-Castro, S., García-Soto, M. J., Aguilar-Aguilar, A., González-Ortega, O., & Rosales-Mendoza, S. (2023). Application of gold nanoparticles in vaccine development. In *Gold*

Nanoparticles for Drug Delivery (pp. 445–493). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-19061-2.00003-1>

Farfán-Castro, S., García-Soto, M. J., Comas-García, M., Arévalo-Villalobos, J. I., Palestino, G., González-Ortega, O., & Rosales-Mendoza, S. (2021). Synthesis and immunogenicity assessment of a gold nanoparticle conjugate for the delivery of a peptide from SARS-CoV-2. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 34. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2021.102372>

Faz Hernández, C. (2023). *Estudio de un inmunoensayo de flujo lateral para la detección de SARS-CoV-2 utilizando nanopartículas de oro como reporteros visuales*. [Trabajo de grado, Tesis de maestría, Universidad Autónoma de San Luis Potosí]. Repositorio Institucional de la UASLP. <https://repositorioinstitucional.uaslp.mx/xmlui/handle/i/8321>

Hermanson, G. T. (2013). Microparticles and Nanoparticles. In *Bioconjugate Techniques* (pp. 549–587). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-382239-0.00014-5>

Hormozi-Nezhad, M. R., Karami, P., & Robotjazi, H. (2013). A simple shape-controlled synthesis of gold nanoparticles using nonionic surfactants. *RSC Advances*, 3(21), 7726–7732. <https://doi.org/10.1039/c3ra40280k>

Jiang, C., Yao, X., Zhao, Y., Wu, J., Huang, P., Pan, C., Liu, S., & Pan, C. (2020). Comparative review of respiratory diseases caused by coronaviruses and influenza A viruses during epidemic season. *Microbes and Infection*, 22(6–7), 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2020.05.005>

Menachery, V. D., Yount, B. L., Debbink, K., Agnihothram, S., Gralinski, L. E., Plante, J. A., Graham, R. L., Scobey, T., Ge, X. Y., Donaldson, E. F., Randell, S. H., Lanzavecchia, A., Marasco, W. A., Shi, Z. L., & Baric, R. S. (2015). A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nature Medicine*, 21(12), 1508–1513. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0924-2>

Moussout, H., Ahlafi, H., Aazza, M., & Maghat, H. (2018). Critical of linear and nonlinear equations of pseudo-first order and pseudo-second order kinetic models. *Karbala International Journal of Modern Science*, 4(2), 244–254. <https://doi.org/10.1016/j.kijoms.2018.04.001>

- Papaneophytou, C. P., & Kontopidis, G. (2014). Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: A general review. In *Protein Expression and Purification*, 94, 22-32. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.10.016>
- Rando, H. M., Lordan, R., Lee, A. J., Naik, A., Wellhausen, N., Sell, E., Kolla, L., Gitter, A., Greene, C. S., Bansal, V., Barton, J. P., Boca, S. M., Boerckel, J. D., Brueffer, C., Byrd, J. B., Capone, S., Das, S., Dattoli, A. A., Dziak, J. J., ... Wellhausen, N. (2023). Application of Traditional Vaccine Development Strategies to SARS-CoV-2. *MSystems*, 8(2). <https://doi.org/10.1128/msystems.00927-22>
- Salazar-González, J. A., González-Ortega, O., & Rosales-Mendoza, S. (2015). Gold nanoparticles and vaccine development. In *Expert Review of Vaccines*, 14(9), 1197-1211. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.1064772>
- Sánchez-Iglesias, A., Grzelczak, M., Altantzis, T., Goris, B., Pérez-Juste, J., Bals, S., Van Tendeloo, G., Donaldson, S. H., Chmelka, B. F., Israelachvili, J. N., & Liz-Marzán, L. M. (2012). Hydrophobic interactions modulate self-assembly of nanoparticles. *ACS Nano*, 6(12), 11059–11065. <https://doi.org/10.1021/nn3047605>
- Sridhara Rao, D. V, Muraleedharan, K., & Humphreys, C. J. (2010). *TEM specimen preparation techniques*.
- WHO. (2024, June 5). *WHO Coronavirus (COVID-19)*. <https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths?n=c>
- Wong-Arce, A., Gonzalez-Ortega, O., Romero-Maldonado, A., Miranda-López, A., García-Soto, M., Farfán-Castro, S., Betancourt-Mendiola, L., Teeravechyan, S., Srisutthisamphan, K., Comas-García, M., Solís Andrade, K. I., & Rosales-Mendoza, S. (2024). Production and Immunogenicity Assessment of LTP50: An *Escherichia coli*-Made Chimeric Antigen Targeting S1- and S2-Epitopes from the SARS-CoV-2/BA.5 Spike Protein. *Pharmaceuticals*, 17(3), 302. <https://doi.org/10.3390/ph17030302>
- Zhang, L., Mazouzi, Y., Salmain, M., Liedberg, B., & Boujday, S. (2020). Antibody-Gold Nanoparticle Bioconjugates for Biosensors: Synthesis, Characterization and Selected Applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 165, 112370. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112370>