



**Evaluación de las bases moleculares para el diseño de vacunas de ARN con aplicación
en veterinaria**

Paredes Ramos, Gabriela Nicole

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga

Dra. Ramos Gómez, Thelvia Isabel, PhD(c)

05 de marzo de 2023

Informe de originalidad

NOMBRE DEL CURSO

Revisión de tesis

NOMBRE DEL ALUMNO

GABRIELA NICOLE PAREDES RAMOS

NOMBRE DEL ARCHIVO

GABRIELA NICOLE PAREDES RAMOS - Revisión de tesis

SE HA CREADO EL INFORME

5 mar 2023

Resumen

Fragmentos marcados	3	0,2 %
Fragmentos citados o entrecomillados	0	0 %

Coincidencias de la Web

patents.google.com	2	0,2 %
passeidireto.com	1	0,1 %

THELVIA
ISABEL
RAMOS
GÓMEZ

Firmado digitalmente por THELVIA ISABEL RAMOS GÓMEZ
Fecha: 2023.03.05 19:15:22 -05'00'

Dra. Ramos Gómez, Thelvia Isabel, PhD(c)

C.C: 1753960028



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: "**Evaluación de las bases moleculares para el diseño de vacunas de ARN con aplicación en veterinaria**" fue realizado por la señorita **Paredes Ramos, Gabriela Nicole**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 05 de marzo de 2023

THELVIA
ISABEL
RAMOS
GÓMEZ

Firmado digitalmente por
THELVIA ISABEL
RAMOS GOMEZ
Fecha: 2023.03.05...
19:07:05 -05'00'

Dra. Ramos Gómez, Thelvia Isabel, PhD(c)

C.C: 1753960028



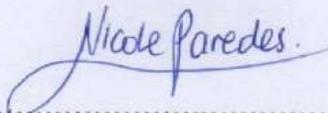
Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Paredes Ramos, Gabriela Nicole**, con cédula de ciudadanía N° 1718938820, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Evaluación de las bases moleculares para el diseño de vacunas de ARN con aplicación en veterinaria** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 05 de marzo de 2023



.....
Gabriela Nicole Paredes Ramos

C.C: 1718938820



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Paredes Ramos, Gabriela Nicole**, con cédula de ciudadanía N° 1718938820, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Evaluación de las bases moleculares para el diseño de vacunas de ARN con aplicación en veterinaria** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 05 de marzo de 2023

Gabriela Nicole Paredes

Gabriela Nicole Paredes Ramos

C.C: 1718938820

Dedicatoria

A mis padres, Juan y Gabriela, por su constante esfuerzo y dedicación en busca de mi bienestar, por apoyarme en cada paso y por todo su amor

A mi hermano, Juan José, por siempre dar alegría a mis días, por inspirarme a ser mejor y por ser mi compañero de vida

A mis abuelas, Margarita y Welmi, por su constante compañía y por su ejemplo de amor y fortaleza que ha revolucionado mi vida

A mi novio, Mateo, por acompañarme en cada momento, por creer profundamente en mí y por amarme genuinamente

Gabriela Nicole Paredes Ramos

Agradecimientos

A Dios, por guiar mi camino y por darme claridad y fortaleza

A la Dra. Thelvia Ramos por darme la oportunidad de ser su tesista, por ampliar mi perspectiva de la ciencia y por su invaluable aporte a mi vida académica y profesional

Al Dr. Jorge Toledo por abrirme las puertas de su laboratorio, por impulsar el desarrollo del presente trabajo y por su valioso aporte a mi formación

Al Ing. Carlos Villacís por los aprendizajes brindados, por guiarme en el laboratorio y por su apoyo, tiempo y paciencia en el desarrollo del presente trabajo

A Mary, Eli, Naty, Felipe, Matheus, Santiago, Carlita, Félix, María Paz, Yerko, Paula, Nico, Vero, Fernando, Brian y a todo el equipo por el apañe y los conocimientos compartidos

A mis abuelos, Juan y Oswaldo, por su ejemplo de perseverancia y por su valiosa presencia en mi vida

A mis tíos, Telmito, Nepta, Marce, Erik, Jonathan y Oswaldo, a mis tías, Verito, Vivi, Karlita, Ivo, Ceci e Isa, a mis primas, Mica y Ari, a mis primos, Diego, Benito y Julián, a Bachis y a toda mi familia por sostenerme, cuidarme y llenar mi vida de amor y enseñanzas

A Tere, Nash y Josué, por ser mi familia en Chile, por recordarme lo valioso de la amistad y por acompañarme en cada paso

A mis amigas y amigos de toda la vida, Mile, Gaby, Salo, Thais, Giani, Esteban, Javier y Kevin, por estar en los buenos y malos momentos, por traer tanta alegría y paz a mi vida

A María, Grace e Indira por compartir el camino universitario conmigo y ser mi apoyo

Al Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción por el acceso a las instalaciones y recursos

Tabla de Contenidos

Informe de Originalidad	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Resumen.....	17
Abstract.....	18
Capítulo I: Introducción.....	19
Planteamiento del problema	19
Justificación del problema.....	21
Objetivos.....	24
Objetivo general	24
Objetivos específicos.....	24
Hipótesis.....	24
Capítulo II: Marco Teórico	25
Vacunas.....	25
Vacunas convencionales.....	25
Vacunas de nueva generación.....	27
Comparación entre las vacunas de ADN y ARNm.	28

Vacunas de ARNm.....	31
Desarrollo de vacunas de ARNm.....	32
Mecanismo de vacunas de ARNm.....	34
Estructura de vacunas de ARNm.....	36
Cap 5'.....	38
UTR.....	39
ORF.....	39
Cola de poli(A) 3'.....	39
Optimización de vacunas de ARNm.....	40
Administración de vacunas de ARNm.....	43
Liposomas.....	44
Nanopartículas lipídicas.....	44
Nanopartículas poliméricas.....	45
Andamiajes.....	46
Capítulo III: Metodología.....	48
Diseño experimental.....	48
Definición de la secuencia para la expresión del ARNm.....	48
Amplificación de pUC MinusMCS – GnGc en <i>E. coli</i>	49
Preinóculo.....	50
Inóculo.....	50
Purificación de pUC MinusMCS – GnGc.....	50

	10
Digestión enzimática para verificar la identidad de pUC MinusMCS – GnGc.....	51
Linealización de pUC MinusMCS – GnGc.....	52
Estandarización de la transcripción <i>in vitro</i> del ARNm	54
IVT	54
Capping enzimático.....	55
Análisis de ácidos nucleicos	56
Cuantificación por espectrofotometría	56
Electroforesis en geles de agarosa.....	57
Establecimiento de las líneas celulares HEK293A y HCT116	57
Descongelación de células.....	57
Mantenimiento de células.....	58
Congelación de células	58
Transfección del ARNm en las líneas celulares HEK293A y HCT116	59
Transfección con PEI	59
Transfección con Lipofectamina 2000	60
Evaluación de la viabilidad celular	60
Ensayo MTT	61
Análisis de la expresión del antígeno	61
Lisis celular	61
Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.....	62
Western Blot	62

	11
Obtención de Gn/Gc.....	62
Anticuerpos monoclonales anti-Gn/Gc.....	63
Western Blot.....	63
Análisis estadístico.....	63
Capítulo IV: Resultados	64
Definición de la secuencia para la expresión del ARNm	64
Purificación de pUC MinusMCS – GnGc.....	70
Digestión enzimática para verificar la identidad de pUC MinusMCS – GnGc.....	71
Linealización de pUC MinusMCS – GnGc.....	72
Estandarización de la transcripción <i>in vitro</i> del ARNm	73
Establecimiento de las líneas celulares HEK293A y HCT116	75
Transfección del ARNm en las líneas celulares HEK293A y HCT116	75
Evaluación de la viabilidad celular	75
Análisis de la expresión del antígeno	78
Capítulo V: Discusión	83
Conclusiones.....	90
Recomendaciones	91
Bibliografía	92
Apéndices	108

Índice de Tablas

Tabla 1 <i>Ventajas y desventajas de las vacunas de ADN y ARNm</i>	28
Tabla 2 <i>Componentes de la reacción de transcripción in vitro</i>	54
Tabla 3 <i>Componentes de la reacción de capping enzimático</i>	56
Tabla 4 <i>Dominios de la unidad transcripcional</i>	65
Tabla 5 <i>Enzimas de restricción de pUC MinusMCS – GnGc</i>	70

Índice de Figuras

Figura 1 Traducción del antígeno y presentación de las vacunas de ARNm en las células del huésped	35
Figura 2 Síntesis de ARNm mediante transcripción <i>in vitro</i> a partir de una plantilla de ADN....	37
Figura 3 Nanotransportadores utilizados para la administración de vacunas de ARNm IVT	46
Figura 4 Estructura de la unidad transcripcional.....	49
Figura 5 Unidad transcripcional GPC.....	64
Figura 6 Clonación de la unidad transcripcional GPC en el vector pUC MinusMCS.....	68
Figura 7 Plásmido pUC MinusMCS – GnGc para la expresión de ARN mensajero	69
Figura 8 Electroforesis en gel de agarosa al 1%, purificación del plásmido pUC MinusMCS – GnGc.....	71
Figura 9 Electroforesis en gel de agarosa al 1%, digestión enzimática de pUC MinusMCS – GnGc.....	71
Figura 10 Electroforesis en gel de agarosa al 1%, linealización de pUC MinusMCS – GnGc con BspQI	72
Figura 11 Electroforesis en gel de agarosa al 1%, linealización de pUC MinusMCS – GnGc con NotI.....	73
Figura 12 Electroforesis en gel de agarosa al 1%, ARNm transcrito <i>in vitro</i>	74
Figura 13 Electroforesis en gel de agarosa al 1%, ARNm con cap 5'	75
Figura 14 Viabilidad en células HEK293A a diferentes concentraciones entre ARNm-PEI y ARNm-Lipofectamina.....	77
Figura 15 Viabilidad en células HCT116 a diferentes concentraciones entre ARNm-PEI y ARNm-Lipofectamina.....	78
Figura 16 Análisis mediante SDS-PAGE al 10% denaturante de la expresión del antígeno Gn/Gc en HEK293A.....	79

Figura 17 <i>Análisis mediante SDS-PAGE al 10% denaturante de la expresión del antígeno Gn/Gc en HCT116</i>	79
Figura 18 <i>Transfección de pEntry GPC y pEGFP en células HEK293A</i>	80
Figura 19 <i>Análisis mediante SDS-PAGE al 10% denaturante y Western Blot de hibridomas productoras de anti-Gn/Gc</i>	81

Abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
APC	células presentadoras de antígeno
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNt	ácido ribonucleico de transferencia
ATP	trifosfato de adenosina
COVID-19	enfermedad por coronavirus
CTL	linfocitos T citotóxicos
CTP	trifosfato de citidina
DC	células dendríticas
DEPC	dietilpirocarbonato
DMEM	medio mínimo esencial Dulbecco
DMSO	dimetilsulfóxido
DOTAP	1,2-dioleoyl-3-trimetilamonio-propano
DPPE	dipalmitoilfosfatidilcolina
eIF3	factor de iniciación eucariota 3
eIF4E	factor de iniciación de la traducción eucariota 4E
GFP	proteína verde fluorescente
GTP	trifosfato de guanosina
HBA1	subunidad alfa de la hemoglobina humana
HCT116	células de carcinoma colorrectal humano
HEK293A	células de riñón de embrión humano
IFIT	proteína inducible por IFN con repeticiones tetratricoides
IFN	interferón
IFN- α	interferón- α
IFN- β	interferón- β
IL-12	interleucina-12
ISG	genes estimulados por IFN
IVT	transcripción <i>in vitro</i>
LB	Luria Bertani
LNP	nanopartículas lipídicas
MDA5	proteína 5 asociada a la diferenciación del melanoma

MHC	complejo mayor de histocompatibilidad
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
OAS	2'-5'-oligoadenilato sintetasa
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
ORF	marco abierto de lectura
PABP	proteína de unión a poli(A)
PBS	buffer fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
PEI	polietilenimina
PG	poliglucina
pHEMA	poli (2-hidroxietil metacrilato)
PRR	receptores de reconocimiento de patrones
RBP	proteínas de unión al ARN
RIG-I	receptores citoplasmáticos tipo gen I inducible por ácido retinoico
S	espermidina
SFB	suero fetal bovino
STAR-IDAZ	Alianza Estratégica para la Investigación de las Enfermedades Infecciosas de los Animales y las Zoonosis
TLR	receptores tipo Toll
TNF- α	factor de necrosis tumoral- α

Resumen

Las enfermedades infecciosas de los animales causadas por agentes patógenos afectan a la salud animal, a la seguridad alimentaria y pueden transmitirse a los humanos. La vacunación es el método más rentable y sostenible para el control de infecciones. Las vacunas de ARN mensajero inducen respuestas inmunitarias fuertes y duraderas, manteniendo ciclos de fabricación rápidos y genéricos. Presentan ventajas sobre las vacunas de ADN como el bajo riesgo de mutagénesis por inserción en el genoma y la expresión transitoria de los antígenos en el organismo. Se ha aprobado el uso de vacunas de ARN mensajero contra la enfermedad por coronavirus, lo que ha validado aún más la plataforma. Se requiere el diseño y la optimización de la secuencia que expresa el ARNm para evitar su degradación, así como sistemas de administración que permitan su traducción eficiente. En el presente trabajo se evaluaron las bases moleculares para el diseño de vacunas de ARN mensajero con aplicación en veterinaria. La secuencia para la expresión del ARN mensajero se definió diseñando una unidad transcripcional de 3743 pares de bases que incluía los elementos estructurales básicos. Las condiciones de la transcripción *in vitro* se estandarizaron y se logró obtener 0,5 µg/µL de ARN mensajero a partir de una plantilla lineal de ADN. El ARN mensajero se transfectó en las líneas celulares HEK293A y HCT116 con los reactivos polietilenimina y lipofectamina para la expresión del antígeno y la evaluación de la viabilidad celular, que indicó que la lipofectamina brinda mejores resultados de transfección. En conclusión, las vacunas de ARN mensajero son una tecnología eficaz y segura, capaz de ser desarrollada rápidamente para prevenir, controlar y finalmente erradicar las enfermedades infecciosas de los animales.

Palabras clave: ARN mensajero, transcripción *in vitro*, enfermedades infecciosas, transfección, viabilidad celular

Abstract

Infectious animal diseases caused by pathogens affect animal health, food safety and can be transmitted to humans. Vaccination is the most cost-effective and sustainable method of infection control. Messenger RNA vaccines induce strong and durable immune responses while maintaining rapid and generic manufacturing cycles. They have advantages over DNA vaccines such as low risk of mutagenesis by insertion into the genome and transient expression of antigens in the body. Messenger RNA vaccines have been approved for use against coronavirus disease, further validating the platform. Design and optimization of the sequence expressing the mRNA to prevent its degradation is required, as well as delivery systems that allow its efficient translation. In the present work, the molecular basis for the design of messenger RNA vaccines with veterinary application was evaluated. The sequence for messenger RNA expression was defined by designing a 3743 base pair transcriptional unit that included the basic structural elements. The *in vitro* transcription conditions were standardized and 0.5 µg/µL of messenger RNA was obtained from a linear DNA template. The messenger RNA was transfected into HEK293A and HCT116 cell lines with polyethyleneimine and lipofectamine reagents for antigen expression and cell viability assessment, which indicated that lipofectamine gives better transfection results. In conclusion, messenger RNA vaccines are an effective and safe technology capable of being rapidly developed to prevent, control and ultimately eradicate infectious diseases in animals.

Key words: messenger RNA, *in vitro* transcription, infectious diseases, transfection, cell viability

Capítulo I: Introducción

Planteamiento del problema

Las enfermedades infecciosas son afecciones causadas por un agente patógeno o su producto tóxico y se transmiten entre huéspedes susceptibles (van Seventer & Hochberg, 2017). Afectan a la salud de los animales y a la seguridad alimentaria pues tienen efectos directos sobre el bienestar animal y los sistemas de producción de alimentos (Entrican & Francis, 2022; Le et al., 2022). Son numerosos los brotes de infecciones en todo el mundo, de fiebre aftosa, peste equina, peste porcina africana, síndrome reproductivo y respiratorio porcino, dermatosis nodular contagiosa, diarrea epidémica porcina, diarrea viral bovina, peste de pequeños rumiantes, entre otros (Le et al., 2022).

Estas patologías repercuten en las economías de todo el mundo debido a las pérdidas en animales que se generan por el aumento de la mortalidad y morbilidad, la reducción de la productividad y los costos asociados, a esto se agregan las repercusiones en el mercado que pueden prolongarse mucho después del brote inicial (Barratt et al., 2019). En 2014-2015 el brote de influenza aviar en Estados Unidos costó 879 millones de dólares al Departamento de Agricultura (USDA) por actividades de identificación, respuesta y recuperación de la emergencia sanitaria (McElwain & Thumbi, 2017).

Las enfermedades infecciosas veterinarias también suponen una importante amenaza para la salud pública porque pueden ser zoonóticas y transmitirse de forma natural de los animales vertebrados a los humanos o al revés (Pan et al., 2021; Rahman et al., 2020). De hecho, alrededor del 75% de las infecciones humanas emergentes son de origen animal (Entrican & Francis, 2022). Se incluyen virus, bacterias, hongos, protozoos y parásitos que, por factores como la urbanización, el cambio climático, el turismo, el comercio de animales, los factores antropogénicos y naturales, provocan enfermedades zoonóticas (Rahman et al., 2020).

Sólo en la última década las zoonosis han costado más de 20.000 millones de dólares y han provocado pérdidas indirectas que superan los 200.000 millones (Barratt et al., 2019). A nivel mundial, estos patógenos han causado 2.400 millones de casos de enfermedad y 2,7 millones de muertes humanas al año (Rahman et al., 2020).

La frecuencia de los brotes de virus zoonóticos ha aumentado en los últimos años (Fomsgaard & Liu, 2021). En 2003 apareció el virus SARS-CoV proveniente de murciélagos y mamíferos (Hui & Chan, 2010), en 2009 la gripe porcina a partir de cerdos (Neumann et al., 2009), en 2012 el MERS-CoV de camellos y murciélagos (Hui & Chan, 2010), en 2014 se presentó el mayor brote de ébola proveniente de murciélagos (Gire et al., 2014), en 2015 el virus del Zika a partir de mosquitos y monos (Y. Liu et al., 2017), y el último en 2019 fue el SARS-CoV-2 proveniente probablemente de murciélagos y causante de la pandemia de enfermedad por coronavirus (COVID-19) (Andersen et al., 2020; Zhou et al., 2020). Otros patógenos importantes que afectan a los humanos son el virus de la rabia (Rahman et al., 2020) el virus de la gripe aviar (Boseret et al., 2013) y el virus de la hepatitis E (Le et al., 2022). Debido a la estructura y composición de su material genético, los virus tienen un alto potencial de mutación y por ello que pueden aparecer nuevas variantes virales a medida que se propagan a través de miles de animales por mutaciones de adaptación y aumento de la patogenicidad o infectividad (Fomsgaard & Liu, 2021).

En general, se carece de estrategias eficaces de control de las enfermedades infecciosas en animales (Le et al., 2022). Entonces, es imprescindible buscar soluciones para detener la transmisión de los patógenos (Fomsgaard & Liu, 2021). La vacunación es una potencial solución a esta problemática, al ser menos costosa y más beneficiosa que una estrategia de sólo sacrificio de los animales infectados (Barratt et al., 2019).

Justificación del problema

La vacunación ha contribuido en gran medida a la medicina veterinaria como una estrategia de intervención eficaz para la prevención de las enfermedades infecciosas en animales (Le et al., 2022; Pan et al., 2021). Las vacunas preparan y utilizan el sistema inmunitario del cuerpo para que reconozca y combata diversos patógenos (Pan et al., 2021), lo que ha reducido significativamente el impacto de enfermedades de importancia en el ganado y animales de compañía (Jorge & Dellagostin, 2017).

Se busca que las vacunas para prevenir enfermedades infecciosas en los animales incluyan: (1) respuestas inmunitarias fuertes y duraderas; (2) protección de amplio espectro contra todas las cepas en todas las especies infectadas para limitar la potencial transmisión; (3) posibilidad de discriminación entre los animales vacunados e infectados; (4) ausencia de recombinación entre las vacunas y las cepas; (5) fabricación barata y (6) fácil administración (Le et al., 2022). El costo final de una vacuna depende del costo de producción, el número de dosis necesarias para generar inmunidad protectora y la infraestructura para su distribución (Entrican & Francis, 2022).

Históricamente, el proceso de desarrollo y fabricación de vacunas profilácticas ha sido largo y puede durar décadas, como la vacuna contra la varicela (Beaudoin et al., 2022). Hasta hace veinte años todas las vacunas veterinarias eran microorganismos vivos atenuados o inactivados (Jorge & Dellagostin, 2017), sin embargo, han evolucionado desde los enfoques convencionales que emplean patógenos, proteínas y péptidos hasta las vacunas de nueva generación que usan ácidos nucleicos (Bouazzaoui et al., 2021).

Si bien las vacunas convencionales han permitido inmunizar animales contra distintas enfermedades desde hace siglos (Jorge & Dellagostin, 2017), la elevada tasa de mortalidad de ciertos patógenos, las crecientes tasas de infección y la transmisión generalizada han

provocado que se evalúen y establezcan otras plataformas como las vacunas de nueva generación (Entrican & Francis, 2022)).

El desarrollo de estas nuevas tecnologías de vacunación para humanos y especies veterinarias ha sido liderado por enfoques moleculares (Jorge & Dellagostin, 2017). Así, han cobrado interés las vacunas de ácidos nucleicos que se basan en el ácido desoxirribonucleico (ADN) o el ácido ribonucleico (ARN), que codifican el antígeno o los antígenos de interés para que el sistema inmunitario del huésped reconozca las proteínas expresadas como extrañas e induzca una respuesta inmunitaria innata y en consecuencia las respuestas adaptativas celular y humoral (Entrican & Francis, 2022; Fomsgaard & Liu, 2021; Jorge & Dellagostin, 2017).

En general estos vectores de administración superan varias barreras de los enfoques tradicionales por la rapidez en la fabricación de los constructos, las propiedades inmunoestimulantes intrínsecas de estas moléculas, la presencia *in vivo* relativamente temporal de la proteína codificada, la amplificación del sistema inmunitario incluso frente a pequeñas cantidades de antígeno y las ventajas de fabricación que incluyen procesos genéricos y rápidos (M. A. Liu, 2019).

El desarrollo de vacunas veterinarias convencionales suele tardar entre 3 y 6 años (Entrican & Francis, 2022). La utilización de vacunas de ácidos nucleicos rompe este cuello de botella por su fácil y rápido diseño a partir de la secuencia de nucleótidos de la proteína antigénica deseada (Beaudoin et al., 2022; Fomsgaard & Liu, 2021), lo que resulta mucho más seguro que inactivar o atenuar un patógeno y más sencillo que fabricar una proteína recombinante (M. A. Liu, 2019). Incluso puede combinar diferentes genes simultáneamente para obtener vacunas multivalentes o rediseñarse en caso de mutaciones que cambien los epítomos para el anticuerpo neutralizante (Fomsgaard & Liu, 2021). Además, el constructo genético puede expresar sólo el antígeno sin otras proteínas que pueden ser nocivas como las

toxinas o que resulten irrelevantes para la protección, aunque sean Inmunodominantes (M. A. Liu, 2019).

Para los animales se han autorizado algunas vacunas de ADN, contra el virus del Nilo Occidental en caballos (Davidson et al., 2005), el melanoma en perros (Bergman et al., 2006), la necrosis hematopoyética infecciosa en salmones (Garver et al., 2005), entre otros. Sin embargo, últimamente la atención se ha centrado más en las vacunas de ARN mensajero (ARNm) ya que presentan algunas ventajas sobre las de ADN (Entrican & Francis, 2022; Melo et al., 2022). Entre ellas, que tienen bajo riesgo de mutagénesis por inserción en el genoma, alta potencia biológica y eficacia terapéutica, con ciclos de desarrollo acelerados y potencial de fabricación a escala comercial de bajo costo y alta velocidad (Le et al., 2022).

De hecho, por la pandemia de COVID-19 se aceleró el desarrollo de esta tecnología y en 2021 se aprobó de emergencia las dos primeras vacunas de ARNm para humanos fabricadas por BioNTech/Pfizer (Polack et al., 2020) y Moderna (Baden et al., 2021). Consisten en moléculas de ARNm que codifican directamente la proteína de la espiga del virus SARS CoV-2 y están formuladas dentro de nanopartículas lipídicas para su administración (Entrican & Francis, 2022). Se ha informado una notable eficacia de hasta el 70-90% contra dos variantes del virus después de la segunda dosis (Beaudoin et al., 2022). Este hecho ha validado aún más la plataforma y ha allanado el camino para el avance de su uso en la medicina veterinaria (Le et al., 2022).

Disponer de una plataforma vacunal basada en ARN mensajero podría hacer avanzar estratégicamente la comercialización de vacunas eficaces y seguras (Le et al., 2022; M. A. Liu, 2019). Se están desarrollando vacunas de ARNm para la prevención de enfermedades infecciosas animales y en la zoonosis, por ejemplo, contra la fiebre aftosa (Le et al., 2022), la rabia (Stitz et al., 2017), la influenza (Freyn et al., 2020) y los flavivirus transmitidos por mosquitos (Roth et al., 2019). Varias vacunas de ARNm han entrado en ensayos clínicos y los

resultados son prometedores (Le et al., 2022). Por tanto y demás, la vacunación de los animales con ARNm es clave para protegerlos contra enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes, ya que beneficia la salud animal y además protege a la humanidad contra potenciales patógenos zoonóticos (Fomsgaard & Liu, 2021).

En consecuencia, el presente trabajo de investigación busca evaluar las bases moleculares para el diseño de vacunas de ARN mensajero, mediante la definición de la secuencia de ADN que exprese el ARNm por transcripción *in vitro* y la posterior transfección en líneas celulares para la expresión del antígeno. Con el fin de que, en un futuro, se puedan desarrollar vacunas eficaces y seguras que permitan controlar infecciones animales rápidamente.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar las bases moleculares para el diseño de vacunas de ARN con aplicación en veterinaria.

Objetivos específicos

- Definir la secuencia para la expresión del ARN mensajero mediante herramientas bioinformáticas.
- Estandarizar las condiciones de la transcripción *in vitro* del ARN mensajero.
- Expresar el antígeno a través de la transfección del ARN mensajero en las líneas celulares HEK293 y HCT116.

Hipótesis

La transfección con el ARN mensajero permite la expresión del antígeno que codifica en las líneas celulares HEK293 y HCT116.

Capítulo II: Marco Teórico

Vacunas

El campo de la vacunología aparece tras una serie de descubrimientos empíricos e innovaciones tecnológicas (Entrican & Francis, 2022). Al ser el método más rentable y sostenible de prevenir las enfermedades infecciosas, desde 1796 se utilizan las vacunas para inmunizar a animales y personas (Karam & Daoud, 2022; Xu et al., 2020). Su uso ha permitido erradicar completamente enfermedades como la viruela (Greenwood, 2014) y la peste bovina (Karam & Daoud, 2022). Sin embargo, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) actualmente ha identificado más de 118 enfermedades animales como de declaración obligatoria (McElwain & Thumbi, 2017), por lo que junto con la Alianza Estratégica para la Investigación de las Enfermedades Infecciosas de los Animales y las Zoonosis (STAR-IDAZ) buscan acelerar el desarrollo de herramientas y estrategias para controlar las infecciones animales en todo el mundo (Entrican & Francis, 2022). Para anticipar y responder a los nuevos patógenos (Fomsgaard & Liu, 2021), los pasos clave en la fase de investigación del desarrollo de vacunas incluyen la caracterización del patógeno, la respuesta inmunitaria del huésped, la producción y administración de antígenos, y la evaluación de la seguridad y la eficacia (Entrican & Francis, 2022).

Vacunas convencionales

La introducción de un antígeno en el organismo para estimular una respuesta inmunitaria inicialmente se realizaba con vacunas: vivas atenuadas, inactivadas, de subunidades y toxoides (Pilkington et al., 2021). Las vacunas vivas atenuadas se basan en patógenos de virulencia reducida que inducen una respuesta inmunitaria fuerte y duradera (Bouazzaoui et al., 2021). Actualmente se obtienen haciendo pasar el virus por una serie de cultivos celulares o embriones animales para que acumulen mutaciones que medien la

atenuación de la virulencia, como es el caso de las vacunas contra la poliomielitis, la rubéola, la gripe, entre otras (Karam & Daoud, 2022). Sin embargo, la principal preocupación es que tienen un potencial riesgo de reversión del microorganismo a un fenotipo virulento (Jorge & Dellagostin, 2017). En consecuencia, se desarrollaron las vacunas inactivadas que alteran el material genético y/o las proteínas del patógeno mediante técnicas químicas o físicas para destruir su capacidad de replicación (Karam & Daoud, 2022). Estas suelen ser más seguras (Le et al., 2022), pero necesitan múltiples inmunizaciones para conseguir la respuesta necesaria (Bouazzaoui et al., 2021) y ser formuladas junto con adyuvantes que disminuyen su eficacia (Jorge & Dellagostin, 2017; Pan et al., 2021). El proceso de fabricación de ambas puede requerir mucho tiempo y recursos significativos, con tasas de éxito potencialmente bajas (Beaudoin et al., 2022).

En cambio, las vacunas de subunidades emplean sólo uno o unos pocos antígenos del patógeno, en lugar de usar todo el organismo, lo que provoca que el sistema inmunitario genere anticuerpos contra estos antígenos específicos (Karam & Daoud, 2022). Esto mejora los perfiles de seguridad y permite la diferenciación entre animales infectados y vacunados (Entrican & Francis, 2022). Sin embargo, presentan inmunidad protectora limitada contra un virus heterogéneo y necesitan adyuvantes para controlar enfermedades por inmunidad celular y no solo humoral (Entrican & Francis, 2022; Le et al., 2022). Mientras que las vacunas basadas en toxoides para inmunizar contra enfermedades bacterianas utilizan las toxinas inactivadas en lugar del patógeno, como en el caso del tétanos (Yen & Thwaites, 2019), la difteria (Whitaker et al., 2019) y la tos ferina (Edwards & Decker, 2018). Pero inducen una inmunidad adaptativa moderada por lo que requieren de adyuvantes como sales de aluminio o dosis de refuerzo (Karam & Daoud, 2022).

El desarrollo de las tecnologías de ADN recombinante permitió sintetizar secuencias genéticas, manipular el genoma de los patógenos y expresar proteínas recombinantes que

imiten una infección natural, lo que elimina la necesidad de trabajar con el patógeno virulento durante la fabricación de vacunas (Entrican & Francis, 2022). Así aparecieron las vacunas recombinantes que utilizan estos antígenos diseñados y altamente purificados que facilitan la identificación de los determinantes de las respuestas inmunitarias protectoras, pero tienen una inmunogenicidad débil por la falta de componentes exógenos de activación inmunitaria y dependen de adyuvantes potentes y seguros para garantizar su éxito (Jorge & Dellagostin, 2017; Pan et al., 2021). Además, con esta plataforma se presentan otros inconvenientes como garantizar que el antígeno tenga las modificaciones postraduccionales correctas, que esté adecuadamente plegado y que sea soluble (Beaudoin et al., 2022).

Si bien los enfoques mencionados han tenido éxito, su proceso de desarrollo es relativamente lento y presentan un bajo rendimiento para hacer frente a los brotes de infecciones patógenas, por lo que varias enfermedades aún no han logrado ser tratadas con una vacuna eficaz (Jorge & Dellagostin, 2017; Xu et al., 2020). En consecuencia, se requieren enfoques alternativos para producir vacunas más seguras y eficaces, que permitan prevenir, controlar y finalmente erradicar las patologías animales (Entrican & Francis, 2022; Jorge & Dellagostin, 2017).

Vacunas de nueva generación

Las vacunas de vectores virales recombinantes se basan en la administración de antígenos insertados en el genoma de un vector viral que ha mantenido o perdido su capacidad de replicación (Humphreys & Sebastian, 2018). En las últimas décadas, surgieron como plataformas de vacunas prometedoras por su capacidad de inducir respuestas inmunes celulares y humorales potentes sin la necesidad de adyuvantes adicionales, no obstante, la posible integración en el genoma del huésped o la replicación persistente se asocian a riesgos elevados para la salud del individuo (Karam & Daoud, 2022). Recientemente la utilización de ácidos nucleicos, tanto el ADN como el ARNm, ha promovido una revolución en la vacunología

(Fomsgaard & Liu, 2021). En las vacunas de ácidos nucleicos el antígeno es expresado *in situ* por las células del huésped y al ser reconocido como no propio se induce la respuesta inmune (Pilkington et al., 2021). Este enfoque está diseñado para generar inmunidad contra el patógeno sin comprometer la seguridad del receptor de la vacuna (Leal et al., 2018). Una vez conocida la secuencia que codifica el inmunógeno de interés se pueden producir lotes de vacunas de ácidos nucleicos en poco tiempo, lo que es útil cuando se producen mutaciones de un virus conocido (Pilkington et al., 2021).

Comparación entre las vacunas de ADN y ARNm. Las vacunas de ADN y, ahora, las de ARNm han suscitado gran interés por su potencial como plataformas de administración de vacunas profilácticas (M. A. Liu, 2019). Ambas presentan varias ventajas y desventajas, como se describe en la Tabla 1.

Tabla 1

Ventajas y desventajas de las vacunas de ADN y ARNm

	Ventajas ARNm	ADN
Seguridad	<ul style="list-style-type: none"> - No infeccioso, no se integra en el genoma del huésped, riesgo reducido de carcinogénesis y mutagénesis - Producción sintética por transcripción <i>in vitro</i> (libre de células) - Imita la infección viral natural y es degradado por procesos celulares naturales - No hay producción de inmunidad anti vectorial, por lo que son posibles múltiples administraciones 	<ul style="list-style-type: none"> - No infeccioso - Perfil de seguridad bueno

Ventajas		
	ARNm	ADN
Estabilidad y manufactura	<ul style="list-style-type: none"> - Diseño fácil, rápido y reproducible - Producción escalable - Purificación downstream simple - Fabricación rentable - Legislación EE. UU: mayor rapidez en la traslación clínica pues no es considerado terapia génica como el ADN 	<ul style="list-style-type: none"> - Temperatura estable, sin cadena de frío - Mayor tiempo de vida media <i>in vivo</i> en comparación con el ARNm
Aplicación clínica	<ul style="list-style-type: none"> - Se entrega en el citosol y es fácilmente traducible - Estimula la respuesta inmune innata (autoadyuvante) - Induce respuestas de células T y B - Síntesis rápida de proteínas con corta vida media, expresión transitoria que llega a su pico a las 5-7 h y exposición controlada al antígeno 	<ul style="list-style-type: none"> - Mayor eficacia en la producción de antígenos, cada plásmido de ADN produce múltiples copias de moléculas de ARNm - Expresión y suministro constantes de antígenos, hasta 6 meses de producción de proteínas - Estimula la respuesta inmune innata
Desventajas		
	ARNm	ADN
Seguridad	<ul style="list-style-type: none"> - Pocos informes de eficacia y ningún perfil de seguridad a largo plazo que incluya efectos secundarios a largo plazo, perfiles de intoxicación aguda y crónica, abuso o uso indebido, comprensión de la interacción adversa con otros medicamentos, sustancias químicas o alimentos - Activación de sensores inmunitarios celulares 	<ul style="list-style-type: none"> - Inflamación de leve a moderada en el lugar de la inyección - Producción de autoanticuerpos anti-ADN - Preocupación por la posible integración del ADN en el genoma del huésped - Persistencia a largo plazo del plásmido de ADN durante más de 60 días

Desventajas		
	ARNm	ADN
Entrega <i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Rápida degradación de ARNm desnudo o no modificado por RNasas extra e intracelulares - Entrega ineficiente en las células por la carga negativa e incapacidad de difusión pasiva a través de la membrana celular - La sobreestimulación conduce a la activación del interferón-α (IFN-α), que puede ser perjudicial para la traducción 	<ul style="list-style-type: none"> - Baja acumulación tisular, gran tamaño y carga negativa - Rápida degradación enzimática y corta circulación sistémica - Barreras extracelulares e intracelulares
Aplicación clínica	<ul style="list-style-type: none"> - Vehículos de entrega necesarios para evitar barreras extracelulares e ineficiente escape endosomal - Los requisitos de almacenamiento y manipulación de los productos clínicos actuales requieren cadena de frío o ultra frío, lo que dificulta la distribución de vacunas 	<ul style="list-style-type: none"> - Requiere transporte eficaz al núcleo, debe atravesar la membrana celular y nuclear - Las técnicas de administración como la electroporación provocan daños tisulares y alteración irreversible de la membrana - Baja inmunogenicidad

Nota. Adaptado de “From influenza to COVID-19: Lipid nanoparticle mRNA vaccines at the frontiers of infectious diseases” (p. 16), por Pilkington et al., 2021, *Acta Biomaterialia*, 131.

Las características clave para usar el ARNm como alternativa a la tecnología de ADN son las siguientes: (1) el ARNm se traduce en el citoplasma y no necesita entrar al núcleo celular; (2) la probabilidad de integrarse al genoma del huésped es insignificante; (3) la cinética de expresión proteica es más consistente y predecible que la de inicio espontáneo del ADN; (4) es transitoriamente activo lo que beneficia la expresión transitoria de proteínas, no se vuelve

una carga para la homeostasis del huésped y además no se comunica con los genes presentes en él (Oluwagbemi et al., 2022; Xiong et al., 2018; Xu et al., 2020).

Vacunas de ARNm

Con la gran innovación tecnológica y la inversión en investigación, el desarrollo de las vacunas de ARNm como una herramienta inmunoterapéutica se ha impulsado rápidamente (Xiong et al., 2018). En estas prometedoras vacunas, el ARN monocatenario se transcribe *in vitro* a partir de un plásmido de ADN, el ARNm que codifica a un antígeno diana se inyecta *in vivo* para traducir múltiples copias de la proteína antigénica y que el organismo induzca una respuesta inmunitaria (Pilkington et al., 2021). Se trata de un proceso multifacético y de múltiples pasos (Xiong et al., 2018), que incluye (1) la construcción de la secuencia optimizada de ARNm codificante del antígeno; (2) el ensayo y la elección de adyuvantes, vehículos portadores y vías de administración; (3) la detección de la expresión *in vivo* del antígeno codificado y el nivel de las respuestas inmunes inducidas; y (4) la investigación y demostración de los mecanismos de inducción inmunitaria (Xu et al., 2020). El antígeno traducido tendrá las propiedades naturales de glicosilación y conformación, lo que soluciona las limitaciones que presentan los antígenos proteicos (Karam & Daoud, 2022; Verbeke et al., 2019).

El ARNm se puede sintetizar para expresar cualquier proteína de interés y puede modificarse con facilidad para alterar su potencial inmunoestimulador (Karam & Daoud, 2022). Además, se puede mantener o incluso estandarizar el proceso de producción y solo cambiar los antígenos codificados para fabricar otras vacunas de ARNm (Xu et al., 2020).

Las enfermedades infecciosas tienden a mutar rápido, por lo que la producción rápida y flexible de las vacunas de ARNm suple esta necesidad urgente (Verbeke et al., 2019). El valor del mercado de las vacunas de ARNm ha alcanzado decenas de miles de millones de dólares, lo que amplía la perspectiva para la investigación y desarrollo de este campo (Xu et al., 2020).

Desarrollo de vacunas de ARNm

El ARNm fue descubierto por primera vez en 1961 (Brenner et al., 1961). El desarrollo de vacunas basadas el ácido ribonucleico inició hace más de 30 años y ha implicado el trabajo de cientos de investigadores (Dolgin, 2021). En 1971 se logró por primera vez la traducción de proteínas a partir de ARNm aislado de células vivas (Gurdon et al., 1971). En 1978 se utilizaron estructuras grasas llamadas liposomas para transportar ARNm a células de ratón (Dimitriadis, 1978) y células humanas (Ostro et al., 1978) con el fin de expresar proteínas. A continuación (Melton et al., 1984) utilizaron una enzima de síntesis de ARN tomada de un virus, junto con otras herramientas, para producir ARNm biológicamente activo en el laboratorio. Después de inyectarlo en huevos de rana demostraron que funciona igual que el ARNm auténtico (Krieg & Melton, 1984). A finales de 1987 se transportó el ARNm sintético con liposomas de carga positiva a células humanas, que absorbieron el material genético y empezaron a producir proteínas a partir de él, y en 1989 se demostró que los embriones de rana absorbían ese mismo ARNm (Malone et al., 1989).

El éxito de estos experimentos provocó que el ARNm empiece a ser explorado como un potencial agente terapéutico para diversas enfermedades (Karam & Daoud, 2022). En 1990, los científicos demostraron que la inyección directa de ARNm, transcrito *in vitro* y asociado a liposomas, inducía la expresión de la proteína codificada en el músculo de ratones (Wolff et al., 1990). Más tarde en 1993, se probó en ratones un ARNm sintético transportado por liposomas aniónicos que codifica la nucleoproteína del virus de la gripe, consiguiendo inducir linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos del virus que atacaban eficazmente las células infectadas (Martinon et al., 1993). Aunque docenas de laboratorios académicos y empresas trabajaron en la formulación de vacunas de ARNm, se frenó su desarrollo durante muchos años ya que se consideraba que este ácido nucleico era demasiado inestable, propenso a la degradación y su producción demasiado cara para ser utilizado como fármaco (Dolgin, 2021).

Dos hechos fueron imprescindibles para cambiar la percepción y la realidad del ARNm (M. A. Liu, 2019). El primero es la relación entre la estructura del ARNm y su eficacia traduccional, ya que diversos métodos de modificación química pueden potenciar su utilidad terapéutica (Stanton & Murphy-Benenato, 2018). Y el segundo es la forma de entregar el ARNm para resistir múltiples barreras extracelulares e intracelulares, evitar la degradación enzimática y mejorar el transporte citosólico (Xiong et al., 2018).

Katalin Karikó y Drew Weissman descubrieron que el ARNm sintético excitaba una serie de sensores inmunitarios conocidos como receptores tipo Toll (TLR), que son los primeros en actuar frente a señales de peligro de los patógenos, por lo que alterar parte del código genético del ARNm ayuda a evitar estas defensas inmunitarias innatas de la célula (Karikó et al., 2004). En el 2005, ambos investigadores descubrieron que la reorganización de los enlaces químicos de la uridina, uno de los nucleósidos del ARN, creaba un análogo conocido como pseudouridina que hacía que el ARNm transcrito *in vitro* fuera menos inmunogénico (Karikó et al., 2005). Posteriormente se demostró que el uso de la pseudouridina también daba lugar a un ARNm más estable y con mayor capacidad de traducción (M. A. Liu, 2019). La utilización de nanopartículas lipídicas (LNP) también fue crucial para proteger al ARNm y transportarlo hacia las células, esta tecnología clave fue desarrollada por Pieter Cullis desde 1990 (Dolgin, 2021).

Con el paso del tiempo se consolidaron empresas como CureVac, Moderna y BioNTech, dedicadas a la investigación y el desarrollo del ARNm (Dolgin, 2021). Inicialmente pocos inversores y científicos parecían interesados en ellas, pero trabajaron en la tecnología durante mucho tiempo y la Agencia de Proyectos de Investigación Avanzada de Defensa de Estados Unidos comenzó a financiar estas investigaciones para estudiar vacunas y fármacos de ARN en 2012 (Dolgin, 2015). Finalmente, con las vacunas de ARNm contra el COVID-19, llegó el éxito de esta plataforma pues actualmente son las vacunas más importantes y rentables de la historia (Dolgin, 2021).

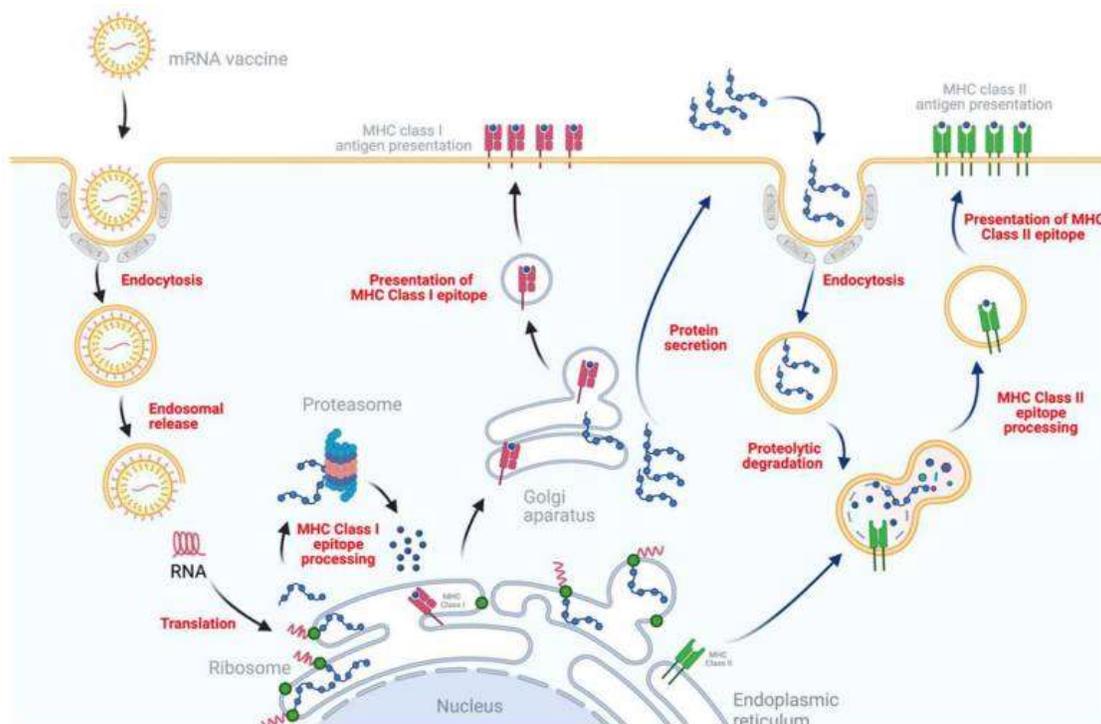
Mecanismo de vacunas de ARNm

El sistema de entrega de la vacuna transporta el ARNm a las células presentadoras de antígeno (APC), como las células dendríticas (DC), los macrófagos y las células de Langerhans (Le et al., 2022). El ARNm ingresa al citoplasma mediante endocitosis, se libera por escape endosomal y se traduce a la proteína antigénica (Verbeke et al., 2019). Los antígenos se procesan en el sistema ubiquitina-proteasoma a epítomos peptídicos que se unen al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I en el citoplasma y clase II en los lisosomas, después los complejos se dirigen a la superficie celular donde presentan los epítomos a los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ para generar una respuesta citotóxica, en el caso del MHC I, y a los linfocitos T cooperadores CD4⁺ para inducir una respuesta de anticuerpos, en el caso del MHC II (Le et al., 2022; Verbeke et al., 2019). Además, el antígeno de interés secretado en el dominio extracelular es ingerido por las APC (Le et al., 2022).

En una posterior infección del huésped con el patógeno, las CD8⁺ activadas pueden eliminar selectivamente las células infectadas que expresan el antígeno específico, mientras que las CD4⁺ activadas pueden proporcionar ayuda para promover la actividad de los linfocitos T citotóxicos e interactuar con las células B para producir anticuerpos multifuncionales de alta afinidad y lograr una inmunidad humoral también (Le et al., 2022; Verbeke et al., 2019; Xiong et al., 2018). En la Figura 1 se ilustra este mecanismo.

Figura 1

Traducción del antígeno y presentación de las vacunas de ARNm en las células del huésped



Nota. Tomado de “mRNA Vaccine Development for Emerging Animal and Zoonotic Diseases” (p. 401), por Le et al., 2022, *Viruses*, 14.

El ARNm tiene propiedades autoadyuvantes que activan respuestas inmunitarias adaptativas fuertes y duraderas mediante la secreción del IFN- α , el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y otras citoquinas como la interleucina-12 (IL-12), por lo que no necesitan adyuvantes adicionales como otras vacunas (Xu et al., 2020). Esta actividad adyuvante también facilita la maduración de las células dendríticas y las células B, así como la activación de los linfocitos T (Karam & Daoud, 2022; Xiong et al., 2018).

Al ser transcrito *in vitro*, el ARNm tiene un efecto inmunoestimulador inherente ya que es reconocido como ARN exógeno por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) del sistema inmune innato, incluyendo los TLR, los receptores citoplasmáticos tipo gen I inducible

por ácido retinoico (RIG-I) y la proteína 5 asociada a la diferenciación del melanoma (MDA5) (Xu et al., 2020). El ARN monocatenario es reconocido a través de TLR7 y TLR8 en los endosomas y las estructuras secundarias de ARN o contaminantes de ARN bicatenario son reconocidos por TLR3 (Verbeke et al., 2019). La activación de los PRR induce una cascada de respuesta inmunitaria que da lugar a la expresión de citoquinas proinflamatorias e IFN tipo I, en particular IFN- α e IFN- β (Xiong et al., 2018). La producción del IFN tipo I induce numerosos tipos de genes estimulados por IFN (ISG) que inhiben la traducción del ARNm, un ejemplo es la proteína inducible por IFN con repeticiones tetratricoides (IFIT) que se puede combinar con la cap 5' o interactuar con el factor de iniciación eucariota 3 (eIF3) para interrumpir la síntesis de proteínas (Xu et al., 2020). Como una respuesta inmunitaria innata, el IFN tipo I también activa enzimas antivirales que promueven la degradación del ARNm e inhiben la expresión del antígeno (Pilkington et al., 2021).

En consecuencia, las vacunas de ARNm tienen un gran potencial para generar anticuerpos neutralizantes y de unión, activar la inmunidad innata, inducir respuestas celulares CD4⁺ y CD8⁺, promover la inmunidad de larga duración y de memoria, lo que proporciona una protección superior contra las enfermedades infecciosas por las respuestas inmunitarias eficaces y duraderas que se generan (Karam & Daoud, 2022; Le et al., 2022).

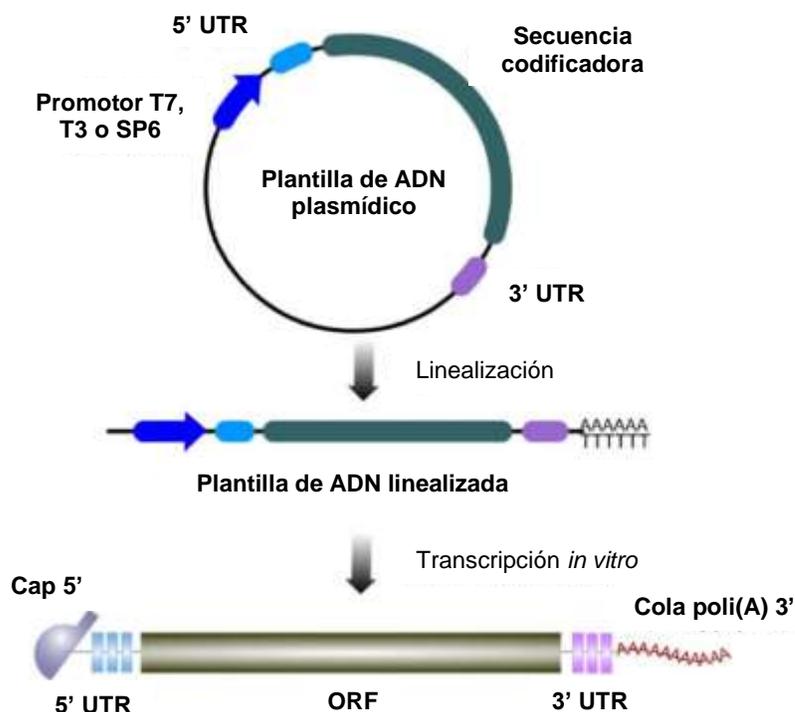
Estructura de vacunas de ARNm

El ARN mensajero es un portador transitorio que lleva la información genética desde los genes hasta los ribosomas para sintetizar las proteínas (X. Huang et al., 2022). Para las vacunas, el ARNm se fabrica mediante transcripción *in vitro* (IVT) en un sistema libre de células, partiendo de una plantilla de ADN que generalmente contiene una secuencia promotora de fago (T7, T3 o SP6) y la secuencia del gen diana (Xiong et al., 2018). Tras clonar el antígeno de interés de forma fácil y rápida en el plásmido de ADN, este se linealiza y se continua con la transcripción mediante una fago polimerasa de ARN T3, T7 o SP6 (Karam &

Daoud, 2022). Aunque también se puede obtener ADN sintético preparado por PCR (Xu et al., 2020). El ARNm IVT es un ARNm monocatenario sintético no replicable que se diseña de forma similar a las moléculas de ARNm maduras que se encuentran de forma natural en el citoplasma de las células eucariotas (Karam & Daoud, 2022). Consta de (1) un marco abierto de lectura (ORF) codificador de proteínas; flanqueado por (2) regiones no traducidas (UTR) en 5' y 3'; y en los extremos (3) una caperuza 5' o cap 5' de 7-metil guanosina y (4) una cola de poliadenilato (poliA) 3' (Verbeke et al., 2019). En la Figura 2 se muestra la plantilla de plásmido de ADN que se linealiza y se transcribe *in vitro* para obtener un ARNm con sus elementos estructurales básicos.

Figura 2

Síntesis de ARNm mediante transcripción in vitro a partir de una plantilla de ADN



Nota. Adaptado de "Biomedical applications of mRNA nanomedicine" (p. 5281), por Xiong et al., 2018, *Nano Research*, 11.

Cap 5'. Es una 7-metilguanosina (m7G) que se une al primer nucleótido del extremo 5' del ARNm a través de un puente 5'-5' trifosfato (Xiong et al., 2018). La cap 5' puede eliminar los grupos fosfato libres de la secuencia de ARNm, lo que mejora significativamente su estabilidad (Xu et al., 2020). También se une al factor de iniciación de traducción eucariota 4E (eIF4E) para promover el inicio de la traducción y a las enzimas de descifrado del ARNm para evitar su degradación (Xiong et al., 2018). La caperuza 5' (m7GpppG) puede adoptar varias estructuras como cap0 (m7G(5')pppN1pN2p) que es una N7-metilguanosina conectada al nucleótido mediante un enlace 5'-5' trifosfato, cap1 (m7G(5')pppN1mpNp) que tiene además una metilación 2'O en el primer azúcar ribosa del ARNm, y cap2 (m7G(5')pppN1mpN2mp) que tiene metilaciones 2'O en las dos primeras ribosas (Karam & Daoud, 2022).

En la IVT se puede agregar la cap 5' al ARNm mediante una modificación cotranscripcional incorporando análogos sintéticos de la cap durante la reacción o una modificación postranscripcional utilizando enzimas de capping recombinantes derivadas del virus vaccinia (Ahammad & Lira, 2020). El primer método es el más común y permite obtener las diferentes estructuras de caperuza, sin embargo, por la competencia entre los análogos y el trifosfato de guanosina (GTP) nativo, parte del ARNm permanece sin cap (Xiong et al., 2018). Además, se ha descubierto que el análogo de la caperuza puede unirse de forma inversa a la secuencia de ARNm lo que forma isómeros y por tanto una baja eficiencia de traducción aguas abajo (Xu et al., 2020). Para evitar esto, se ha desarrollado un análogo cap anti-reversa conocido como ARCA, que tiene una modificación en la posición C2 o C3 para garantizar que los grupos metilo reaccionen con los grupos hidroxilo correctos (Ahammad & Lira, 2020; Xu et al., 2020). En 2018 se desarrolló el CleanCap, que es un método cotranscripcional que utiliza un trímero iniciador para producir una estructura cap 5' (Xu et al., 2020). El segundo método de capping enzimático se limita solo a la estructura de cap estándar (m7GpppG) por la especificidad de la enzima (Xiong et al., 2018).

UTR. Las regiones no codificantes que flanquean el ORF en 5' y 3' no contribuyen directamente a las secuencias proteicas, pero juegan un papel crítico en la decadencia y vida media del ARNm, así como en la eficiencia de la traducción a través de su interacción con proteínas de unión al ARN (RBP) (Karam & Daoud, 2022; Xiong et al., 2018). La 5' UTR está implicada en el reclutamiento de los ribosomas por la presencia del sitio interno de entrada al ribosoma y la elección del codón de inicio, mientras que, la 3' UTR regula la estabilidad del ARNm, determina los niveles de expresión de la proteína al mediar los elementos ricos en adenina-uracilo (AU) y controla la localización del ARNm para facilitar la traducción local (Xiong et al., 2018).

ORF. Es la región codificante que brinda la información genética para expresar el antígeno de interés (Xiong et al., 2018). La tasa de traducción del marco abierto de lectura es crucial (Xu et al., 2020), de forma que la composición de los codones puede tener un impacto significativo en la estabilidad del ARNm y su proceso de traducción (Xiong et al., 2018).

Cola de poli(A) 3'. La poliadenilación es esencial para la síntesis de ARNm funcional ya que lo protege de la degradación por nucleasas mediante la proteína de unión a poli(A) (PABP), que aumenta su estabilidad y su vida media *in vivo* (Xiong et al., 2018). También permite el inicio de la traducción y mejora su eficiencia (Karam & Daoud, 2022). Existen diferentes métodos para sintetizar una estructura poli(A) *in vitro*: se puede incluir en la plantilla de ADN una secuencia poli(T) para conseguir una longitud definida de la cola de poli(A), lo que permite un control reproducible de los lotes; o agregarla en un paso enzimático postranscripcional con la polimerasa poli(A) recombinante derivada de *Escherichia coli*, en este caso se obtienen secuencias de ARNm con diferentes longitudes de poli(A) (Xiong et al., 2018; Xu et al., 2020). La longitud de esta estructura es importante ya que influye en la expresión de las proteínas de interés (Karam & Daoud, 2022).

Optimización de vacunas de ARNm

A pesar de las características únicas que presentan las vacunas de ARNm, su aplicación clínica se ha visto limitada por la falta de estabilidad de la molécula, la propensión a la inestabilidad y la falta de un sistema de administración eficaz (Xiong et al., 2018). Este polinucleótido monocatenario se degrada fácilmente por nucleasas durante la producción *in vitro* y la administración *in vivo*, puede tener dificultades para atravesar la membrana celular por su carga negativa y se cree que sólo una de cada 10.000 moléculas de ARNm escapa de los endosomas en el citoplasma (M. A. Liu, 2019; Xiong et al., 2018).

Tras años de dedicar importantes esfuerzos, las actuales vacunas de ARNm han incorporado innovaciones que van desde modificaciones de la estructura hasta mejorados sistema de administración para entrar a las células (Dolgin, 2021; Verbeke et al., 2019). La optimización de los elementos estructurales se centra en mejorar la estabilidad del ARNm, conseguir una traducción eficiente y estable de las proteínas diana, y reducir el reconocimiento por parte del sistema inmunitario (Xiong et al., 2018; Xu et al., 2020). El desafío clave es encontrar un equilibrio óptimo entre la capacidad de traducción y la adyuvancia de las vacunas, para obtener una inmunogenicidad útil pero segura (Verbeke et al., 2019).

Algunos análogos de la caperuza fosforotioato pueden incrementar la afinidad hacia el factor eIF4E y aumentar la resistencia frente al complejo de decapado de ARNm (Verbeke et al., 2019). La estructura que adopte la cap 5' también es importante, pues los PRR encargados de identificar moléculas asociadas con patógenos son capaces de reconocer al ARNm sin cap y con cap0 e inhibir su traducción (Xu et al., 2020). Los grupos metilo de cap1 y cap2 hacen que la molécula sea estable frente a la ARNasa A, la ARNasa T1 y la ARNasa T2. Por lo que lo óptimo es tener ARNm con la estructura de cap1 o cap2 (Liang et al., 2021).

La secuencia, la estructura secundaria y la longitud de las regiones no codificantes pueden ser modificadas para aumentar el nivel de la expresión *in vivo* del ARNm (Xiong et al., 2018; Xu et al., 2020). Debido a que la 5' UTR afecta directamente a la traducción de la secuencia codificante, se debe evitar que la secuencia de genes sea idéntica a la del ORF para prevenir un falso inicio de la traducción y la sustitución del marco de lectura (Xu et al., 2020). Se puede añadir algunas secuencias particulares, como la secuencia Kozak, para evitar la iniciación de fallos, e incluso se puede utilizar un 5' UTR que contiene N6-metiladenosina (m6A) para que el ARNm se traduzca de forma cap-independiente (Xiong et al., 2018). Mientras que la 3' UTR es una región que concentra factores inestables, como secuencias enriquecidas con adenina-uracilo (AU) y guanina-uracilo (GU), por lo que se pueden evitar estos dinucleótidos inestables e introducir elementos estables que amplíen la vida media del ARNm (Xu et al., 2020). La longitud de esta región no codificante también influye en la localización de las proteínas de membrana, pues se informó que una 3' UTR más larga en la secuencia que codifica la proteína transmembrana CD47 permitió su expresión eficiente en la superficie celular, mientras que una 3' UTR más corta provocó que la proteína se localice principalmente en el retículo endoplasmático (Xiong et al., 2018). Adicionalmente, se pueden utilizar las secuencias 5' UTR del ARNm de la β -globina y 3' UTR de la α y β -globina, ya que están mejor caracterizadas y contienen elementos reguladores de estabilidad y traducción (Karam & Daoud, 2022; Xiong et al., 2018; Xu et al., 2020). Se utilizan la α y β -globina por ser proteínas endógenas con vidas medias largas (Pilkington et al., 2021).

La elección de codones apropiados en la región ORF mejora la eficiencia global de traducción del ARNm (Xu et al., 2020). La optimización de los codones del marco abierto de lectura se puede lograr enriqueciendo el contenido de guanina-citosina (GC) y reduciendo la frecuencia de los dinucleótidos UU y UA (Verbeke et al., 2019; Xiong et al., 2018). También es beneficiosa la sustitución de codones raros por codones sinónimos más abundantes para un

aprovechamiento más eficiente de los ARN de transferencia (ARNt) durante la traducción (Pilkington et al., 2021).

Como se mencionó anteriormente, la incorporación de nucleósidos modificados evita la activación excesiva del sistema inmune (Verbeke et al., 2019). Esto contribuye a tener un perfil de seguridad mejorado al reducir los efectos inflamatorios secundarios y evita las vías antivirales que inducen los IFN tipo I que están programadas para degradar e inhibir el ARNm exógeno (Karam & Daoud, 2022). La sustitución más común es del nucleósido uridina-5'-trifosfato (UTP) por la (1-metil)-pseudouridina (m1Ψ) de origen natural, se ha comprobado que este cambio reduce la actividad de la 2'-5'-oligoadenilato sintetasa (OAS), encargada de regular la escisión del ARNm por la ARNasa L, y disminuye las actividades de la proteína quinasa R, asociada con la inhibición de la traducción (Karam & Daoud, 2022; Verbeke et al., 2019). Otros nucleósidos modificados que se utilizan incluyen N6-metiladenosina (m6A), N1-metiladenosina (m1A), 2-tiouridina (s2U), 5-metiluridina (m5U), 5-metoxiuridina (mo5U), N1-metilpseudouridina (m1ψ), 5-metilcitidina (m5C), 5-hidroximetilcitidina (hm5C), 5-metoxicitidina (mo5C), y 2-metilguano (Xiong et al., 2018).

Una longitud relativamente más larga de la cola de poli(A) permite tener una mayor traducción del ARNm pues se ralentiza la degradación dependiente de la deadenilación en los cuerpos P (gránulos citoplasmáticos de ribonucleoproteína) (Pilkington et al., 2021; Xiong et al., 2018). En un estudio con células HeLa transfectadas se demostró que la expresión de proteínas aumentó a medida que la longitud de poli(A) aumentaba de 14 a 98 residuos (Peng & Schoenberg, 2005). En otra investigación indicaron que una longitud de 100 nucleótidos de la cola de poli(A) permitía una expresión proteica eficiente (Mockey et al., 2006). Y un ARNm optimizado con 120 adenosinas mostró la máxima traducción en células dendríticas (Holtkamp et al., 2006). También se pueden incluir colas de poli(A) segmentadas usando un elemento espaciador de unos diez nucleótidos en la plantilla de ADN, con el fin de tener una mayor vida

media del ARNm (Pilkington et al., 2021). Además, se pueden incorporar análogos de la adenosina, como la 3'-desoxiadenosina o la 8-azaadenosina para proporcionar mayor protección del ARNm frente a la degradación por 3'-exonucleasas (Xiong et al., 2018).

El ARNm después de la transcripción *in vitro* se debe purificar mediante precipitación química, con microesferas, o a través de métodos cromatográficos (Hou et al., 2021; M. A. Liu, 2019) para eliminar ARN no diana, nucleótidos, oligodesoxinucleótidos y proteínas que pueden contaminar y dificultar los procesos posteriores (Xu et al., 2020).

Administración de vacunas de ARNm

Debido a sus propiedades fisicoquímicas, como el gran tamaño y la carga altamente negativa por sus grupos fosfato, del ARNm optimizado sigue enfrentándose a barreras extra e intracelulares (Xiong et al., 2018). Para la vacunación *in vivo* del ARNm se requieren sistemas de administración adecuados que reduzcan el tiempo de exposición sistémica, lo protejan de la degradación por ribonucleasas extracelulares, permitan su entrada a la célula, aseguren el escape endosomal de la molécula y equilibren su distribución (Pilkington et al., 2021; Xiong et al., 2018; Xu et al., 2020).

Inicialmente se aplicaba la inyección directa del ARNm desnudo que, aunque provoca una respuesta inmunitaria, el método de entrega es débil y el ARNm se degrada rápidamente (Xu et al., 2020). Se pueden utilizar métodos físicos como la electroporación (D. Huang et al., 2018), la pistola de genes (X. Sun et al., 2019) y las microagujas (Xu et al., 2020) para mejorar su administración, sin embargo, afectan la estructura fisiológica y la actividad de las células (Pardi et al., 2018). También se utilizaban células dendríticas como vehículo de administración, para lo cual se transfecta el ARNm en las DC *in vitro* y estas se transfieren nuevamente al cuerpo del huésped para que inicie la respuesta inmunitaria, lo que requiere mucho tiempo y dinero (Xu et al., 2020). Después se empezó a combinar el ARNm con protamina, un pequeño péptido

catiónico natural rico en arginina (Karam & Daoud, 2022). El resultado fueron partículas acomplejadas de diferentes diámetros que, si bien protegen eficazmente al ARNm, también causan una fuerte reacción inmune que puede limitar la eficiencia de traducción (Xu et al., 2020).

Los avances en biomateriales y nanotecnologías abrieron la posibilidad de encapsular el ARNm en diferentes vehículos de administración (Xiong et al., 2018), que se describen a continuación.

Liposomas. Fue el primer sistema de administración utilizado para las vacunas de ARNm (Martinon et al., 1993). Se trata de pequeñas vesículas formadas por una o más bicapas lipídicas que imitan la membrana celular, formadas por lípidos con carga neutra o positiva (Karam & Daoud, 2022). Se encargan de empaquetar y proteger el ARNm en su núcleo acuoso interno (Dolgin, 2021). Los liposomas de carga neutra más utilizados son dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y fosfatidilserina, sin embargo, actualmente el interés se ha centrado en los liposomas catiónicos como 1,2-dioleoyl-3-trimetilamonio-propano (DOTAP) ya que atrapan el ARNm con mayor eficiencia por las interacciones electrostáticas (Karam & Daoud, 2022). También se pueden modificar los liposomas con moléculas de manosa para que se dirijan al receptor de manosa CD206 de las células dendríticas (Wang et al., 2018). Se han comercializado sistemas basados en lípidos como la Lipofectamina, de Invitrogen, para la transfección celular *in vitro* de ácidos nucleicos, incluido el ARNm (Pilkington et al., 2021).

Nanopartículas lipídicas. Son las más conocidas ya que dictaron el éxito de las vacunas de ARNm contra el COVID-19 en 2020 (Pan et al., 2021). Las LNP tienen un tamaño de 80-200 nm y puede transfectarse fácilmente en el citoplasma de las células por endocitosis (Xu et al., 2020). A diferencia de los liposomas, no tienen un núcleo acuoso y consisten en una mezcla discontinua de diferentes componentes lipídicos, que comúnmente incluye: (1) un lípido catiónico ionizable que tenga carga positiva a pH bajo para permitir la complejación del ARNm y sea neutro a pH fisiológico para reducir los posibles efectos citotóxicos; (2) un fosfolípido

auxiliar para promover la unión celular; (3) colesterol para mejorar la estructura y rellenar los huecos que quedan entre los demás lípidos; y (4) un lípido polietilenglicol (PEG) para estabilizar las partículas, reducir la opsonización por proteínas séricas y evitar el aclaramiento reticuloendotelial (Karam & Daoud, 2022; Pilkington et al., 2021). Las proporciones dependen de las características fisicoquímicas deseadas, como el tamaño y morfología de las partículas de ARNm, pero la proporción molar 50:10:38,5:1 es bastante utilizada (Pilkington et al., 2021). Este vehículo de administración beneficia en gran medida la liberación endosomal por una mezcla entre los lípidos ionizados de las nanopartículas y los fosfolípidos aniónicos de la membrana endosomal, lo que desencadena una desestabilización de la membrana y el escape de las moléculas de ARNm (Verbeke et al., 2019). Sin embargo, se requiere un dispositivo de mezcla de microfluidos para generar las LNP (Karam & Daoud, 2022).

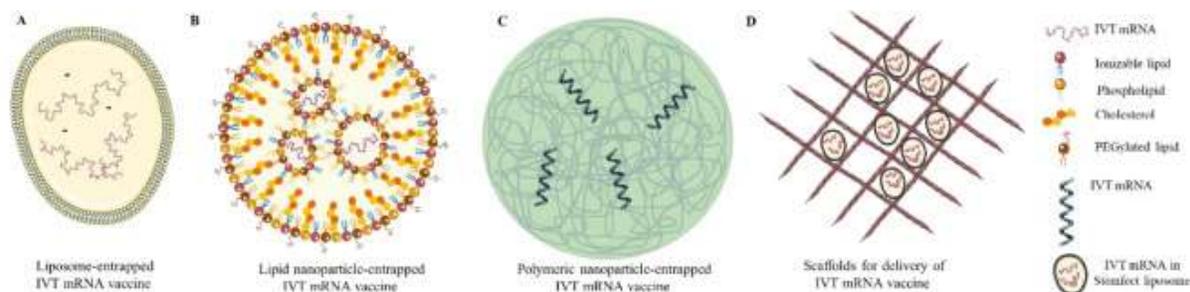
Nanopartículas poliméricas. Al igual que los anteriores, se utilizan para formar complejos con el ARNm y generar nanopartículas mediante interacciones electrostáticas ya que los polímeros catiónicos a menudo constan de grupos amina, además son fáciles de sintetizar y tienen alta flexibilidad química (Xiong et al., 2018). Se diseñaron para superar la incapacidad de los lípidos de abrir las uniones epiteliales estrechas para llegar a las APC subyacentes, usualmente se usa un conjugado compuesto de β -ciclodextrina (β -CD) y polietilenimina (PEI) (Karam & Daoud, 2022). El PEI es el polímero catiónico hidrofílico más estudiado, tiene una fuerte carga positiva por los grupos amina, que le permite condensar el ARNm y contribuir a su escape endosomal al funcionar como una "esponja de protones" en el entorno ácido de los endosomas, sin embargo, una de las principales limitaciones de su uso es el efecto tóxico que posee, en parte debido a su carga positiva (Tan et al., 2020). Actualmente se han adoptado sistemas de polímeros biodegradables para una administración más segura de ARNm, como el conjugado de poliglucina (PG) y espermidina (S) (Karam & Daoud, 2022). El uso de este

sistema para la administración de ARNm es reciente y se necesitan más investigaciones para explorar su aplicación *in vivo* (Cánepa et al., 2017; Xiong et al., 2018).

Andamiajes. Los andamios son construcciones tridimensionales (3D) de ingeniería tisular que funcionan como una matriz sobre la que se atrapan nanopartículas para tener una liberación sostenida del fármaco, en este caso del ARNm (Karam & Daoud, 2022). Apenas se ha probado exitosamente un andamio polimérico tridimensional constituido por poli (2-hidroxietil metacrilato) (pHEMA) para la administración alternativa de una vacuna comercial de ARNm mediante la implantación subcutánea en ratones (Chen et al., 2018). En la Figura 3 se representan los sistemas de administración descritos.

Figura 3

Nanotransportadores utilizados para la administración de vacunas de ARNm IVT



Nota. (A) vacuna de ARNm envuelta en liposomas, (B) vacuna de ARNm envuelta en nanopartículas lipídicas, (C) vacuna de ARNm envuelta en nanopartículas poliméricas y (D) andamiajes para la administración de vacunas de ARNm. Adaptado de “mRNA vaccines: Past, present, future” (p. 491), por Karam & Daoud, 2022, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17.

Continúan en estudio plataformas de administración de ARNm basadas en nanopartículas híbridas que combinan varios componentes, como lípidos, polímeros, péptidos e

incluso nanomateriales inorgánicos, ya que es posible que integrar múltiples características proporcione más funcionalidad y flexibilidad a la transfección del ARNm (Xiong et al., 2018).

Otro parámetro clave que determina la eficacia y la seguridad de las vacunas de ARNm, es la elección de las vías de administración, ya que se pueden encontrar barreras extracelulares específicas y por tanto requerir optimizaciones correspondientes (Verbeke et al., 2019). Las principales vías son la inyección intramuscular, intradérmica o subcutánea, sin embargo, para reducir el estrés, el dolor y el costo de las vacunaciones en animales se están evaluando vías de administración oral y en aerosol, que no son invasivas (Le et al., 2022).

Capítulo III: Metodología

Diseño experimental

El objetivo del presente trabajo fue evaluar las bases moleculares para el diseño de vacunas de ARN con aplicación en veterinaria. La secuencia para la expresión del ARN mensajero se definió identificando el antígeno de elección, obteniendo la secuencia correspondiente de la base de datos y diseñando la unidad transcripcional. Una vez sintetizado el plásmido de ADN y amplificado en *E. coli*, se purificó y linealizó para estandarizar las condiciones de la transcripción *in vitro* del ARNm, al que se le agregó la cap 5' en un paso postranscripcional. El ARNm purificado se transfectó en las líneas celulares HEK293A y HCT116 para expresar el antígeno y evaluar la viabilidad celular.

Definición de la secuencia para la expresión del ARNm

El antígeno seleccionado corresponde al precursor de glicoproteínas GPC de la cepa Andes del virus Hanta, que después de ser escindido, da lugar a las glicoproteínas de superficie Gn y Gc por una modificación postraduccional (Moreno Sandoval et al., 2014). La secuencia correspondiente se obtuvo de la base de datos GenBank de NIH y se utilizó la herramienta bioinformática SnapGene para su edición y clonación *in silico*.

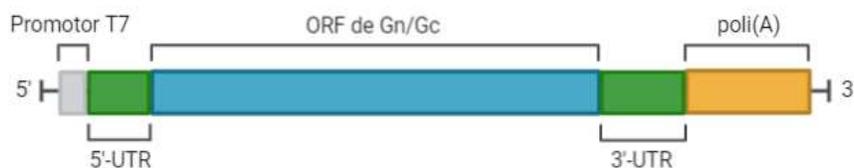
Se diseñó la unidad transcripcional tomando en cuenta que, para que la molécula de ARN mensajero exprese correctamente el antígeno al ingresar a las células, debe poseer todos los dominios estructurales y funcionales de un ARNm eucariota maduro (Karam & Daoud, 2022). Y tomando como referencia la vacuna de ARNm contra el COVID-19 creada por la empresa de biotecnología Moderna (Stewart-Jones, 2021; Stewart-Jones et al., 2021).

Por tanto, el molde de ADN a utilizar en la transcripción *in vitro* fue diseñado considerando los siguientes dominios: (1) promotor T7; (2) región no traducida 5' (5' UTR); (3) marco abierto de lectura (ORF) de las proteínas Gn y Gc de la cepa Andes de Hantavirus; (4)

región no traducida 3' (3' UTR); y (5) cola de poli(A) de 100 nucleótidos de longitud, como se muestra en la Figura 4.

Figura 4

Estructura de la unidad transcripcional



Nota. Creado con Biorender.

En SnapGene se clonó la unidad transcripcional (3743 pb) en el vector Blue Heron pUC MinusMCS (3171 pb), lo que resultó en la conformación del plásmido pUCMinusMCS – GnGc, que se flanqueó por sitios de restricción que permitan clonarlo en otros vectores de expresión.

El vector se envió a sintetizar con la empresa Blue Heron Biotech a través del Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción, Chile. Se recibió el plásmido pUC MinusMCS – GnGc (Blue Heron Biotech, EE. UU) que contenía el inserto y una punción en agar bacteriano del mismo plásmido en células de *E. coli*. El ADN plasmídico purificado llegó en una solución de buffer TE 1X (10 mM Tris, 1 mM EDTA). Y el agar bacteriano (1% de triptona, 0,5% de extracto de levadura, 1% de cloruro de sodio, 0,7% de agar) se suministró como un sólido de 1 mL con la cepa bacteriana inoculada.

Amplificación de pUC MinusMCS – GnGc en *E. coli*

El plásmido de interés insertado en *E. coli* se clonó mediante el crecimiento de las bacterias en medio de cultivo Luria Bertani (LB), compuesto de triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7,5 (Tüzmen et al., 2018).

Preinóculo

El agar que contenía las bacterias transformadas con el plásmido pUC MinusMCS – GnGc se cortó con un asa bacteriológica y se sembró en 5 mL de medio LB (Liofilchem, Italia) junto con 100 µg/mL de ampicilina (USBiological, EE. UU) a lado de un mechero. Se incubó a 37°C en agitación constante a 1500 rpm durante 20 horas.

Inóculo

Del preinóculo se utilizó 1 mL para inocular un matraz que contenía 300 mL de medio LB junto con 100 µg/mL de ampicilina. El matraz se incubó a 37°C en agitación constante a 1500 rpm durante 20 horas.

Purificación de pUC MinusMCS – GnGc

El plásmido pUC MinusMCS – GnGc se purificó de *E. coli* mediante lisis alcalina. El cultivo bacteriano del matraz se centrifugó a 8000 rpm y 4°C durante 10 minutos. El precipitado se resuspendió con 10 mL de la solución I (glucosa 50 mM (Merck, Alemania), Tris-HCl 25 mM (Calbiochem, Inglaterra), EDTA 10 mM (Calbiochem, Inglaterra), ARNasa 10 mg/mL (US Biologicals, EE. UU.), pH 8,0) y se transfirió a un tubo de 50 mL. Las células se lisaron agregando 10 mL de la solución II (NaOH 0,2 M (Merck, Alemania), SDS 1% (p/v) (Merck, Alemania)), se agitó manualmente y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se añadieron 10 mL de la solución III (acetato de potasio 5 M (Merck, Alemania), ácido acético glacial (Merck, Alemania)), enseguida se agitó generosamente hasta que se formó un precipitado blanco y se incubó en hielo durante 15 minutos. La mezcla resultante se centrifugó dos veces a 10 000 rpm y 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante se filtró para eliminar cualquier precipitado restante y se añadió un volumen de isopropanol (Merck, Alemania). El tubo se centrifugó a 10 000 rpm y 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante se desechó y se secó exhaustivamente el precipitado a temperatura ambiente. A continuación, al

precipitado se le adicionaron 600 μL de agua estéril y se resuspendió. Para evitar la contaminación por ARN se le añadió 2 μL de ARNasa A (Invitrogen, EE. UU) a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubó a 37°C durante 2 horas (Birnboim & Doly, 1979).

Para los siguientes pasos se utilizó el kit E.Z.N.A Cycle Pure (Omega Bio-Tek, EE.UU). Del volumen obtenido previamente se extrajeron 100 μL en un microtubo al que se le añadieron 4 volúmenes del buffer CP y se mezcló a fondo por vórtex. La solución se transfirió a una columna de purificación que estaba insertada en un tubo de colección y se centrifugó a 13 000 x g durante 1 minuto. El filtrado se desechó y se reusó el tubo de colección. En la columna se dispensaron 700 μL del buffer de lavado diluido con etanol absoluto (Merck, Alemania), se centrifugó a 13 000 x g durante 1 minuto, se descartó el filtrado y se reusó el tubo de colección. Se repitió el lavado y después se centrifugó la columna vacía a 13 000 x g durante 2 minutos para eliminar las trazas de etanol. Se transfirió la columna a un nuevo microtubo y el ADN plasmídico contenido se eluyó con 150 μL de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC), dejando reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos y centrifugando a 13 000 x g durante 1 minuto. El plásmido pUC MinusMCS – GnGc purificado se almacenó a -20°C (Omega Bio-Tek, 2017).

Digestión enzimática para verificar la identidad de pUC MinusMCS – GnGc

Se realizó una digestión enzimática con tres enzimas de restricción de alta fidelidad, EcoRV, SacI y KpnI de la casa comercial New England Biolabs (R. U), para verificar la identidad del plásmido. Con el software SnapGene se determinaron las combinaciones adecuadas para que las enzimas generen cortes de diferentes tamaños. En la reacción 1 se combinaron SacI y EcoRV, en la reacción 2 SacI y KpnI, y en la reacción 3 únicamente SacI. Para cortar 1 μg de ADN plasmídico se utilizó 1 μL de cada enzima, junto con 2 μL del buffer CutSmart 1X (New England Biolabs, R. U) y se llevó la reacción a un volumen final de 20 μL

con agua. Se incubó a 37°C durante 3 horas para que se lleve a cabo la digestión enzimática (New England Biolabs, 2018).

Linealización de pUC MinusMCS – GnGc

La linealización de pUC MinusMCS – GnGc se realizó con dos enzimas de restricción de alta fidelidad, BspQI y NotI, de la casa comercial New England Biolabs (R. U). Para cortar 15 µg de ADN plasmídico, se utilizaron 7,5 µL de la enzima BspQI, junto con 30 µL del buffer CutSmart 1X y se llevó la reacción a un volumen final de 300 µL con agua DEPC. Se incubó a 37°C durante 12 horas para que el plásmido se corte en dos fragmentos, en uno de ellos estaba contenida la plantilla de ADN que expresa el ARNm de interés (New England Biolabs, 2018).

La reacción enzimática con BspQI se corrió en un gel de agarosa al 1% (p/v) para separar el fragmento de interés. La recuperación del fragmento linealizado del gel se hizo con los reactivos del kit GeneJET Gel Extraction (Thermo Scientific, EE. UU). El segmento de gel donde estaba el fragmento de interés se cortó y solubilizó con el buffer de unión en relación 1:1 (peso: volumen) e incubación a 55 °C por más de 10 minutos. La solución mezclada por vórtex se transfirió a una columna de purificación que estaba insertada en un tubo de colección y se centrifugó a 10 000 rpm durante 1 minuto. El filtrado se desechó y se reusó el tubo de colección. En la columna se dispensaron 700 µL del buffer de lavado diluido con etanol absoluto, se centrifugó a 10 000 rpm durante 1 minuto, se descartó el filtrado y se reusó el tubo de colección. Después se centrifugó la columna vacía a 10 000 rpm durante 1 minuto para eliminar las trazas de etanol. Se transfirió la columna a un nuevo microtubo y la plantilla de ADN contenida se eluyó con 40 µL de agua DEPC, dejando reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos y centrifugando a 10 000 rpm durante 1 minuto (Thermo Scientific, 2015). Adicionalmente, para evitar la degradación del ARNm en la IVT, se purificó la plantilla de ADN con fenol/cloroformo. A la plantilla de ADN eluida se le agregó un volumen de

fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25:24:1 (Merck, Alemania), se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 minutos y se recuperó la fase acuosa en un nuevo tubo. Se repitió dos veces el paso anterior y el volumen resultante se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M, pH 5,2 (Merck, Alemania). Se incubó a -20°C durante 30 minutos y se centrifugó a 10 000 rpm por 12 minutos. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se lavó con 500 µL de etanol 70% v/v (Merck, Alemania) centrifugando a 10 000 rpm por 10 minutos. Finalmente, la plantilla de ADN cortada con BspQI y purificada se resuspendió con 60 µL de agua DEPC y se almacenó a -20°C (Sambrook & Russell, 2006).

Para cortar 15 µg de ADN plasmídico, se utilizaron 4 µL de la enzima NotI, junto con 30 µL del buffer CutSmart 1X y se llevó la reacción a un volumen final de 300 µL con agua DEPC. Se incubó a 37°C durante 3 horas y se trató con 7 µL de fosfatasa (New England Biolabs, R. U) y 34,1 µL de su respectivo buffer para que no se vuelva a unir el plásmido, pues NotI realiza un solo corte. Se incubó nuevamente a 37°C durante 30 minutos para que actúe la fosfatasa y a 80°C por 2 minutos para inactivarla (New England Biolabs, 2018).

Para evitar la degradación del ARNm en la IVT, se purificó la plantilla de ADN con el kit E.Z.N.A Cycle Pure. Al volumen obtenido previamente en la linealización se le añadieron 4 volúmenes del buffer CP y se mezcló a fondo por vórtex. La solución se transfirió a una columna de purificación que estaba insertada en un tubo de colección y se centrifugó a 13 000 x g durante 1 minuto. El filtrado se desechó y se reusó el tubo de colección. En la columna se dispensaron 700 µL del buffer de lavado diluido con etanol absoluto, se centrifugó a 13 000 x g durante 1 minuto, se descartó el filtrado y se reusó el tubo de colección. Se repitió el lavado y después se centrifugó la columna vacía a 13 000 x g durante 2 minutos para eliminar las trazas de etanol. Se transfirió la columna a un nuevo microtubo y la plantilla de ADN se eluyó con 60 µL de agua DEPC, dejando reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos y

centrifugando a 13 000 x g durante 1 minuto. Finalmente, la plantilla de ADN cortada con NotI y purificada se almacenó a -20°C (Omega Bio-Tek, 2017).

Estandarización de la transcripción *in vitro* del ARNm

Las recomendaciones que se siguieron para evitar la degradación del ARNm incluyen: usar siempre guantes y cambiarlos cuando entren en contacto con cabello, piel o suciedad, utilizar material libre de ARNasas y exclusivo para ARN, autoclavar y hornear puntas con filtro y microtubos, usar agua tratada con DEPC al 0,1%, trabajar en cámara de flujo vertical y con mascarilla, limpiar a fondo los instrumentos y superficies, y por último mantener el ARN en hielo durante el trabajo y almacenar a -80°C (New England Biolabs, 2022a).

IVT

La plantilla de ADN linealizada se transcribió *in vitro* para sintetizar el ARNm con el kit HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis (New England Biolabs, R. U). La reacción de IVT se montó a temperatura ambiente siguiendo el orden de la Tabla 2.

Tabla 2

Componentes de la reacción de transcripción in vitro

Componente	Cantidad	Concentración final
Agua DEPC	X μ L	
Buffer de reacción 10X	2 μ L	1X
ATP (100 mM)	2 μ L	10 mM
GTP (100 mM)	2 μ L	10 mM
UTP (100 mM)	2 μ L	10 mM
CTP (100 mM)	2 μ L	10 mM
Plantilla de ADN	X μ L	1 μ g
Polimerasa T7 ARN	2 μ L	
Volumen total de la reacción	20 μL	

Nota. Tomado de “HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit”, por New England Biolabs, 2022b.

Los componentes se mezclaron bien y se incubó a 37°C durante 2 horas (New England Biolabs, 2022b). Los transcritos de ARNm se purificaron para eliminar las proteínas y la mayoría de los nucleótidos libres y sales, utilizando el kit de limpieza de transcripción MEGAclean (Ambion, EE. UU). La muestra de ARNm se llevó a 100 µl con agua DEPC, se mezcló a fondo y se agregaron 350 µL del buffer de unión que se mezclaron suavemente. A la solución se añadieron 250 µL de etanol absoluto, que se transfirieron a una columna de purificación que estaba insertada en un tubo de colección y se centrifugó a 10 000 x g durante 1 minuto. El filtrado se desechó y se reusó el tubo de colección. En la columna se dispensaron dos veces 500 µL del buffer de lavado diluido con etanol absoluto, se centrifugó a 10 000 x g durante 1 minuto, se descartó el filtrado y se reusó el tubo de colección. Después se centrifugó la columna vacía a 10 000 x g durante 30 segundos para eliminar las trazas de etanol. Se transfirió la columna a un nuevo microtubo y el ARNm se eluyó dos veces con 50 µL de agua DEPC, incubando en un bloque térmico a 65°C durante 10 min y centrifugando a 10 000 x g durante 1 minuto. Finalmente, el ARNm purificado y sin cap 5' se almacenó a -80°C (Ambion, 2012).

Capping enzimático

En un solo paso postranscripcional, al ARNm purificado se le agregó enzimáticamente la caperuza en el extremo 5' seguido de una 2'-O-metilación por una metiltransferasa para tener una estructura cap1, usando el kit Vaccinia Capping System (New England Biolabs, R. U), que puede sintetizar hasta 10 µg de ARNm cap1 en una reacción de 20 µl. En este caso, se llevaron a cabo 5 reacciones y para mejorar la estabilidad, se mezclaron los 50 µg de ARNm sin cap con 5 µl del inhibidor de ARNasa RiboLock 20 U/uL (Thermo Scientific, EE. UU), y se llevó a un volumen final de 70 µl con agua DEPC. La solución de ARNm se calentó a 65 °C

durante 10 minutos para eliminar la estructura secundaria de la transcripción en el extremo 5' y se incubó en hielo durante 5 minutos. A continuación, la reacción de capping se montó a temperatura ambiente siguiendo el orden de la Tabla 3 (New England Biolabs, 2022c).

Tabla 3

Componentes de la reacción de capping enzimático

Componente	Cantidad (x5)
ARNm sin cap	70 µL
Buffer de capping 10X	10 µL
GTP (10 mM)	5 µL
SAM (4 mM)	5 µL
Enzima Vaccinia Capping (10 U/ µL)	5 µL
ARNm Cap 2'-O- metiltransferasa (50 U/ µL)	5 µL
Volumen total de la reacción	100 µL

Nota. Tomado de “Vaccinia Capping System”, por New England Biolabs, 2022c.

Los componentes se mezclaron bien y se incubó a 37°C durante 1 hora (New England Biolabs, 2022c). Para después continuar con la transfección a células de mamíferos, se purificó el ARNm con cap 5' mediante el kit de limpieza de transcripción MEGAclean, siguiendo el mismo procedimiento descrito en la IVT a partir de los 100 µL obtenidos (Ambion, 2012).

Análisis de ácidos nucleicos

Cuantificación por espectrofotometría

Las muestras de ADN y ARNm se cuantificaron por espectrofotometría en el lector de placas Synergy HTX (Agilent, EE. UU) configurando el software para ADN de doble cadena y ARN de cadena simple, según corresponda. Se utilizó agua como blanco y las mediciones se hicieron por duplicado (Heptinstall & Rapley, 2000).

Electroforesis en geles de agarosa

Las electroforesis de ADN y ARNm se efectuaron en geles de agarosa al 1% (p/v) con buffer TAE 1X y bromuro de etidio. Las muestras se prepararon con buffer de carga 1X y se utilizó un marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, EE.UU). El gel se corrió a 100V durante 40 minutos aproximadamente y se visualizó bajo luz ultravioleta (Yilmaz et al., 2012).

Establecimiento de las líneas celulares HEK293A y HCT116

Se utilizaron las células de riñón de embrión humano HEK293A (ATCC CRL 1573) y las células de carcinoma colorrectal humano HCT116 (ATCC CCL 247). El trabajo en cultivo celular se realizó en cámara de flujo laminar vertical (Telstar AV-100, Japón) y el medio de cultivo utilizado fue Medio Mínimo Esencial Dulbecco (DMEM) (Gibco, EE. UU), suplementado con 0,3 mg/mL de L-glutamina (Gibco, EE. UU) y antibiótico/antimicótico (penicilina/estreptomicina) 1X (Gen Clones, EE. UU) (Gibco, 2015).

Descongelación de células

Para descongelar células se utilizó medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% (Sigma, EE. UU). La descongelación de las células se realizó calentado el criotubo a 37°C con agitación manual y transfiriendo rápidamente el contenido a un tubo de 15 mL que contenía 5 mL de medio. El tubo se centrifugó a 800 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se eliminó por inversión y el precipitado celular se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo. Se sembraron las células en una placa para cultivo adherente de 100 mm (Corning, EE. UU) con medio, hasta llegar a los 10 mL, y se mantuvieron en incubación a 37°C y 5% CO₂ (Gibco, 2015).

Mantenimiento de células

Para el crecimiento de las células se utilizó medio DMEM suplementado con SFB 10%. La mantención de las células se realizó en placas de 100 mm, comprobando la confluencia con un microscopio invertido (Olympus BH-2, Japón). Se eliminó el medio de crecimiento y se hicieron dos lavados con 3 mL de buffer fosfato salino (PBS) (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM). Se agregó 1 mL de tripsina-EDTA 0,25% (Sigma, EE. UU) y se incubó a 37°C y 5% CO₂ durante 5 minutos. Con 4 mL de medio fresco se hicieron baños en la placa para despegar todas las células, se recolectaron en un tubo de 15 mL y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. El precipitado celular se resuspendió en un volumen determinado de medio de cultivo y las células se contaron en una cámara de Neubauer con una dilución ¼ de azul de tripán, aplicando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{células}}{\text{mL}} = \frac{\# \text{ total de células contadas} \cdot \text{factor de dilución} \cdot 10.000}{\# \text{cuadrantes contados}}$$

Tras el conteo celular se calculó la cantidad de células a sembrar según los requerimientos de densidad celular para cada ensayo. Las placas cultivadas se mantuvieron en incubación a 37°C y 5% CO₂. El medio de cultivo se cambió cuando se presentaba disminución del pH del medio, indicada por la variación de color (Gibco, 2015).

Congelación de células

Para la criopreservación de las células se utilizó medio DMEM suplementado con SFB 20% y dimetilsulfóxido (DMSO) 10% (Sigma, EE. UU). Se eliminó el medio de crecimiento y se hicieron dos lavados con 3 mL de PBS. Se agregó 1 mL de tripsina-EDTA y se incubó a 37°C y 5% CO₂ durante 5 minutos. Con 4 mL de medio fresco se hicieron baños en la placa para despegar todas las células, se recolectaron en un tubo de 15 mL y se contaron en una cámara de Neubauer con una dilución ¼ de azul de tripán. En cada criotubo (Corning, EE. UU) se almacenan de 1,5 a 2 millones de células, por lo que se calculó el volumen de medio de

congelación necesario. Se centrifugaron las células a 800 rpm durante 10 minutos y el precipitado celular se resuspendió en el volumen determinado de medio de congelación. En cada criotubo se dispensó 1 mL de las células en suspensión y se utilizó el sistema Mr. Frosty (Sigma, EE. UU) para congelarlas a -80°C y posteriormente conservarlas en nitrógeno líquido (Gibco, 2015).

Transfección del ARNm en las líneas celulares HEK293A y HCT116

Las células HEK293A y HCT116 se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos (Corning, EE. UU) tratadas con polilisina a una densidad celular de 2×10^5 células/mL en 1 mL de medio de crecimiento DMEM suplementado con 10% de SFB. Se continuó con la transfección cuando se alcanzó el 80% de la confluencia celular. Una hora antes de comenzar el ensayo se lavaron las células con PBS y se cambió el medio de crecimiento por 300 μL de medio sin SFB. El ARNm se usó en una proporción de 1 μg por pocillo y como reactivos de transfección se utilizaron 2 μL de PEI de 25 kDa, 0,81 mg/ml, pH 7,0 (Aldrich, EE. UU) y Lipofectamina 2000 (Invitrogen, EE. UU) por cada μg de ARNm (proporción 1:2). El procedimiento descrito a continuación es para cada pocillo de la placa (Boussif et al., 1995; Invitrogen, 2013).

Transfección con PEI

El ARNm y el PEI se llevaron por separado a 10 μL con glucosa al 5%, se mezclaron en vórtex durante 1 minuto y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. La mezcla de PEI se agregó a la mezcla de ARNm e inmediatamente se mezcló en vórtex durante 2 minutos y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 25 minutos. El volumen final se ajustó a 100 μL con medio DMEM sin SFB. Se sacaron 100 μL de medio de cada pocillo, se añadió suavemente la mezcla de ARNm-PEI a la monocapa celular y se incubó a 37°C y 5% CO_2 durante 12 horas. Pasado este tiempo se agregaron 300 μL de medio DMEM 20% SFB,

para llegar al 10% de SFB en cada pocillo, y se mantuvo en incubación. Después de 24 horas de la transfección se cambió el medio por DMEM fresco 10% SFB. Finalmente, tras 48 horas se analizó la expresión del antígeno (Boussif et al., 1995).

Transfección con Lipofectamina 2000

El ARNm y la lipofectamina se llevaron por separado a 50 μ L con medio de suero reducido Opti-MEM (Gibco, EE. UU). En el caso de la lipofectamina, se aplicó vórtex de 2 a 3 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Mientras que el ARNm se mezcló suavemente con la micropipeta. La solución de lipofectamina se agregó a la de ARNm, se mezcló suavemente varias veces con la micropipeta y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se sacaron 100 μ L de medio de cada pocillo, se añadió suavemente la mezcla de ARNm-Lipofectamina a la monocapa celular y se incubó a 37°C y 5% CO₂ durante 12 horas. Pasado este tiempo se agregaron 300 μ L de medio Opti-MEM 20% SFB, para llegar al 10% de SFB en cada pocillo, y se mantuvo en incubación. Después de 24 horas de la transfección se cambió el medio por Opti-MEM fresco 10% SFB. Finalmente, tras 48 horas se analizó la expresión del antígeno (Invitrogen, 2013).

Evaluación de la viabilidad celular

Las células HEK293A y HCT116 se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos (Corning, EE. UU) tratadas con polilisina a una densidad celular de $1,5 \times 10^5$ células/mL en 100 μ L de medio de crecimiento DMEM suplementado con 10% de SFB. Se dejaron pocillos sin células para que sirvan de blanco. Una hora antes de comenzar el ensayo se lavaron las células con PBS y se cambió el medio de crecimiento por 50 μ L de medio sin SFB. La transfección se realizó de la forma descrita en el apartado anterior, llevando los volúmenes finales a 50 μ L, cambiando la cantidad de ARNm por pocillo a 0.2 μ g y por tanto la cantidad de

PEI y Lipofectamina 2000 a 0.4 μ L. Y, adicionalmente, se realizaron tres diluciones seriadas $\frac{1}{2}$ de los tratamientos de ARN-PEI y ARN-Lipofectamina (Boussif et al., 1995; Invitrogen, 2013).

Ensayo MTT

Se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), para conocer si el ARNm administrado con los diferentes vehículos es citotóxico. Después de 48 horas de la transfección, se sacó el medio que tenía los tratamientos de todos los pocillos. A continuación, a cada pocillo se agregó 100 μ L de medio de crecimiento 10% SFB junto con 10 μ L de MTT (Invitrogen, EE. UU) de concentración 5 mg/mL. La placa se incubó durante 3 horas a 37°C y 5% CO₂. Transcurrido el tiempo se desechó el medio y se agregó 100 μ L de isopropanol 0,01 M en cada pocillo para solubilizar los cristales de formazán. Nuevamente se incubó durante 15 minutos a 37°C y 5% CO₂ y se resuspendió dando suaves golpes a la placa. Finalmente, se leyó la placa en el lector de placas Synergy HTX a 570 nm, usando el isopropanol como blanco (Bahuguna et al., 2017).

Análisis de la expresión del antígeno

Lisis celular

Para la lisis celular se utilizó buffer RIPA (Thermo Scientific, EE. UU) junto con el inhibidor de proteasa PMSF 1X (Thermo Scientific, EE. UU). Previamente todos los pocillos se lavaron tres veces con PBS para eliminar el medio suplementado con SFB y se dispensaron 120 μ L de RIPA+PMSF en cada uno, seguido de una incubación en hielo por 5 minutos. Para despegar completamente las células, se rasparon los pocillos hasta que se formó una solución viscosa que se transfirió a los microtubos correspondientes y se centrifugó a 10 000 x g y 4°C durante 15 minutos para recuperar el sobrenadante y desechar la biomasa celular (Ji, 2010).

Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE

La expresión del antígeno se analizó por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10% y 1,5 mm de espesor, bajo condiciones reductoras. Se prepararon las muestras añadiendo buffer de carga con β -mercaptoetanol 1X (SDS 400 mM, azul de bromofenol 0,1 mM, glicerol 47%, Tris-HCl 60 mM, pH 6.8, β -mercaptoetanol 30%) y calentando a 95°C por 5 minutos. El marcador de peso molecular utilizado fue AccuRuler RGB PLUS Prestained Protein Ladder 10-245 kDa (MaestroGen, EE. UU). El buffer de corrida utilizado contenía agentes desnaturalizantes (glicerol 10%, SDS 2%, β -mercaptoetanol 5%, Tris-base 0.0625 g/L, bromofenol azul 0.001%, pH 6,8) para facilitar la corrida de la muestra. La electroforesis vertical se corrió en una cámara Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, EE. UU) a 100 V durante aproximadamente 1 hora y 30 minutos. Las bandas de proteínas se visualizaron tiñendo el gel con una solución de tinción (2,5 g/L de azul de Coomassie R-250, 45% (v/v) de metanol y 10% (v/v) de ácido acético glacial) durante 1 hora en agitación constante. El gel se destiñó con una solución de destinción (20% (v/v) de metanol y 10% (v/v) de ácido acético glacial) durante toda la noche en agitación constante. El gel fue revelado en el equipo Odyssey (LI-COR Biosciences, EE. UU) para la observación de las bandas (Laemmli, 1970).

Western Blot

Obtención de Gn/Gc. Se transfectaron células HEK293A sembradas en una placa de 100 mm con el vector pEntry GPC que contiene la secuencia codificante para el precursor GPC y el vector pEGFP que expresa la proteína verde fluorescente GFP como control, utilizando PEI como se describe anteriormente y con una proporción de 1 μ g de ADN por cada 10⁶ células (Boussif et al., 1995). A continuación, la lisis celular se realizó con RIPA y el sobrenadante recolectado contenía las glicoproteínas Gn y Gc (Ji, 2010).

Anticuerpos monoclonales anti-Gn/Gc. El Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción donó los sobrenadantes del cultivo de 6 hibridomas productoras de anticuerpos anti-Gn/Gc.

Western Blot. La técnica de Western Blot se empleó para verificar la especificidad de los anticuerpos anti-Gn/Gc producidos por hibridomas, utilizando la Gn/Gc obtenida como muestra. Tras la separación de proteínas mediante SDS-PAGE, el gel de poliacrilamida se transfirió a una membrana de nitrocelulosa BA-85 (Schleicher & Schuell, Alemania) en la cámara de transferencia semihúmeda Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, EE. UU.) utilizando buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.25% (p/v), metanol 20% (v/v)), durante 30 minutos a 25 V, 300 W y 260 mA. La membrana se bloqueó con leche descremada al 5% en TBS 1X durante 2 horas, en oscuridad y agitación constante. Se agregó el anticuerpo primario anti-Gn/Gc y se incubó durante toda la noche a 4°C, en oscuridad y agitación constante. Se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con una solución de lavado que contenía TBS 1X, Tween 0,1 % y SDS 0,01 %. Se incubó con el anticuerpo secundario anti-mouse 790 nm (Jackson ImmunoResearch, EE. UU), diluido 1/30000 en leche descremada al 5% en TBS 1X, durante 1 hora en oscuridad y agitación constante. Se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con la misma solución de lavado y la membrana fue revelada en el equipo Odyssey (Burnette, 1981).

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software GraphPad Prism 9. Los resultados del ensayo MTT se graficaron como el promedio y la desviación estándar de cada tratamiento y se aplicó ANOVA de una vía. Además, se compararon los resultados del tratamiento con PEI y Lipofectamina mediante una prueba t de Student no apareada con corrección de Welch. Los resultados con $p < 0,05$ se consideraron con significancia estadística.

Capítulo IV: Resultados

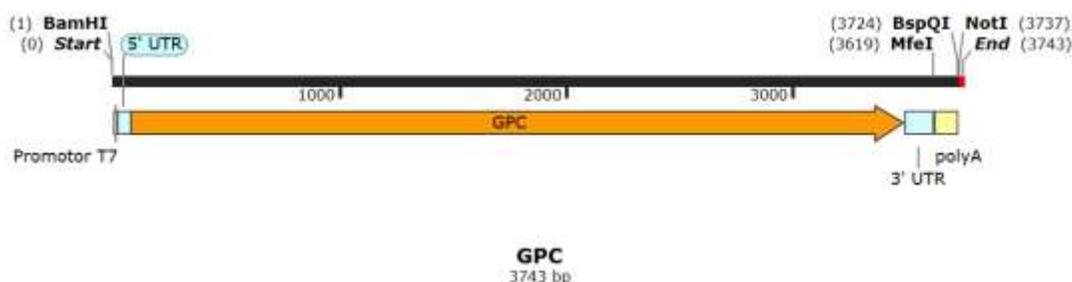
Este trabajo estuvo dirigido a la evaluación de las bases moleculares para el diseño de vacunas de ARN con aplicación en veterinaria. Por tanto, se definió la secuencia para la expresión del ARNm mediante el diseño de la unidad transcripcional. Una vez purificada y linealizada la plantilla de ADN, se estandarizaron las condiciones de la transcripción *in vitro* del ARNm. Por último, se evaluó la viabilidad celular y la expresión del antígeno tras la transfección del ARNm con PEI y Lipofectamina.

Definición de la secuencia para la expresión del ARNm

La secuencia GPC obtenida de GenBank tenía 3417 pb. Utilizando SnapGene se agregaron, en 5' el promotor T7 de 19 pb y una UTR de 57 pb, mientras que en 3' una UTR de 119 pb junto con una cola de poli(A) de 100 residuos. La secuencia se flanqueó por sitios de restricción para clonarlo en diferentes vectores de expresión. En 5' se añadió el sitio de restricción de BamHI (6 pb) y en 3' tanto el sitio de BspQI (11 pb) como el de NotI (8 pb). Entre la 3' UTR y la cola de poli(A) se agregó el sitio de restricción de MfeI (6 pb), para escindir la secuencia de poli(A) si fuera necesario. Como se muestra en la Figura 5, la unidad transcripcional quedó conformada por 3743 pb, que codifican para 1138 aminoácidos.

Figura 5

Unidad transcripcional GPC



Nota. Creado con SnapGene.

La unidad transcripcional se diseñó utilizando los dominios que se describen en la Tabla 4. El promotor utilizado fue de una ARN polimerasa T7 ya que la reacción de transcripción *in vitro* es mediada por esta enzima. Las UTR que se transcriben, pero no se traducen, fueron agregadas para aumentar la estabilidad del ARNm y su traducción. La 5' UTR abarcó desde el sitio de inicio de la transcripción y continuó hasta antes del codón de inicio del ORF. La secuencia 5' UTR utilizada fue desarrollada por Moderna y está recogida en la patente (Stewart-Jones, 2021) como SEQ ID NO: 2. La secuencia Kozak (GCCGCCACCAUGG) fue incluida en la 5' UTR, como se muestra en la Tabla 4, importante para el inicio de la traducción. La 3' UTR comenzó después del codón de parada y continuó hasta la señal de terminación de la transcripción. La secuencia 3' UTR utilizada fue desarrollada por Moderna, está recogida en la patente (Stewart-Jones, 2021) como SEQ ID NO: 4 y proviene del gen de la α -globina humana (HBA1). El ORF comenzó con el codón de inicio AUG (metionina) y terminó con el codón de parada UGA, resaltados en la Tabla 4, y codificó para el precursor GPC que da lugar a las glicoproteínas Gn y Gc. La cola de poli(A) 3', conformada por 100 nucleótidos de adenina, se adicionó al extremo 3' para ayudar en la terminación de la transcripción, proteger al ARNm de la degradación enzimática y aumentar su estabilidad.

Tabla 4

Dominios de la unidad transcripcional

Dominio	Secuencia	Tamaño (pb)
Promotor T7	TAATACGACTCACTATAGG	19
5' UTR	GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGACCCCGCG CCGCCACC	57

Dominio	Secuencia	Tamaño (pb)
GPC	<p>ATGGAGGGCTGGTACCTGGTGGTGCTGGGAGTATGTTATACGCTGACCT TGGCCATGCCCAAACACTATCTATGAGCTTAAAATGGAATGTCCACACACG GTCCGATTGGGACAGGGTTATATAATCGGTTCAACTGAACTGGGCCTCAT CAGTATCGAGGCAGCCAGCGATATTAACCTCGAATCCTCCTGCAATTTG ATTTGCATACTACTTCTATGGCTCAGAAAAGTTTTACCCAAGTTGAATGGC GCAAAAAAAGCGACACCACAGATACGACCAATGCTGCATCAACTACGTT GAAGCTCAGACTAAGACAGTAAATCTGCGGGGCACATGTATCTTGGCCCC AGAACTCTACGACACTCTCAAGAAGGTAAAGAAAACCGTACTTTGCTATGA TTTGACCTGCAATCAGACACATTGCCAGCCGACCGTGTACCTTATAGCCC CGGTGCTGACTTGTATGAGCATCCGGTCTTGCATGGCGTCCGTCTTTACT TCACGGATTCAGGTTATCTATGAGAAGACTCATTGCGTAACTGGACA GATAGAAGGCCAGTGCTTCAACCCCGCTCATACATTGACATTGTCCCAGC CAGCACACACATACGACACCGTGACATTGCCGATTAGTTGTTTCTTTACAC CGAAAAAAGTGAGCAACTGAAGGTGATCAAGACTTTTGAAGGTATCCTTA CAAAAACGGGATGTACTGAAAATGCACTCCAAGGGTACTATGTTTGTCT TGGGCTCTCACAGCGAACCTCTGATCGTGCCATCTCTTGAAGATATCAGA TCCGCCGAAGTAGTAAGCAGAATGCTTGTGCACCCACGAGGAGAAGACC ACGACGCAATACAAAACAGTCAGTCTCATCTCAGAATTGTAGGTCCAATTA CGGCAAAGGTTCCATCAACCTCTTCCACAGATACCCTCAAGGGTACGGCT TTCGCCGGAGTCCCTATGTA CTTCTGTCAACGTTGGTAAGGAATGC CGATCCGGAGTTTGTCTTCTCCCGAATAGTCCCTGAATCAAACACAG CACATGTGACAAGAAAACAGTCCCATCACTTGGACTGGGTATCTCCCTA TTAGCGGCGAAATGGAAAAGGTAACAGGTTGCACGGTGTCTGCACACTC GCAGGACCAGGAGCGTCTGCGAAGCTTATAGCGAAAACGGGATCTTTA ACATTTCTTCCCGACCTGTCTGGTCAATAAAGTACAGCGATTTAGGGGC TCCGAGCAGAAAATAAACTTTATTTGTCAGAGAGTTCGATCAAGACGTCGT GGTGTATTGTAATGGGCAGAAAAGGTAATCTTACTAAAACCTTTGTAAT AGGCCAATGCATCTACACCTTTACTAGCCTTTTTAGTTTGATGCCAGATGT CGCGCATTCTCTGGCAGTAGAACTCTGTGTCCCGGCCTGCATGGCTGG GCCACTGTTATGCTTCTTAGTACCTTCTGCTTTGGCTGGGTCTGATCCC GGCTGTTACTCATTATTCTTAAATGTCTCCGCGTTTTGACCTTCTCCTG CTCTCACTATACAAACGAGTCAAAGTTTAAAGTTCATTCTTGAGAAGGTGAA GATAGAGTATCAGAAGACCATGGGGTCCATGGTCTGCGATGTCTGCCATC ACGAATGTGAGACTGCCAAAGAACTTGAATCCCATAGACAGAGCTGCATT</p>	3417

Dominio	Secuencia	Tamaño (pb)
	<p>AATGGACAATGCCCTACTGCATGACTATCACGGAGGCGACAGAAAGTGC TTTGCAGGCTCATTATTCAATTTGCAAGCTTACGGGACGGTTCAGGAAG CCCTGAAAAAATCTCTGAAAAAACCAGGAAGTAAAAAAGGGCTGCTATCGC ACTCTCGGGGTGTTCCGATATAAGAGTCGATGCTACGTAGGCCTTGTTG GTGTCTCCTGCTGACGTGTGAAATCGTAATATGGGCGGCTAGCGCAGAG ACTCCGCTTATGGAATCTGGCTGGTCCGATACCGCACATGGCGTAGGCG AGATTCCCATGAAAACAGATCTTGAGCTTGACTTCAGCCTCCCTAGTTCAA GTTCTACAGCTATAGAAGGAAGCTTACGAACCCTGCGAATAAAGAAGAA AGTATACCGTTTTCAATTCAGATGGAAAAACAGGTTATACATGCTGAGATA CAACCGTTGGGCCACTGGATGGATGCAACTTTAACATCAAGACTGCTTTT CATTGCTATGGCGCTTGCCAAAAGTACTCCTACCCATGGCAGACGTCCAA GTGTTTCTTCGAAAAAGATTACCAATACGAAACTGGATGGGGATGTAACC CTGGAGATTGCCAGGAGTTGGGACGGGGTGCCTGCCTGCGGAGTTTA CCTGGACAACTCAAGAGTGTAGGTAAGGCCTATAAGATAATATCATTGAA GTATACGAGAAAGGTCTGCATTCAGCTTGGCACAGAGCAAACCTTGCAAAC ACATTGACGCGAATGACTGCCTTGTACACCTAGTGTCAAAGTTTGCATC GTAGGTACTGTTAGCAAACCTTCAGCCGTCGGATACTTTGTTGTTCTTGGGA CCTCGAACAAGGAGGAATCATCCTTAAGCAGTGGTGCACGACAAGCTG CGCGTTTGGAGACCCCGGTGACATAATGAGCACTCCTTCAGGGATGCGG TGTCCCAGCATAACAGGATCTTTCGGGAAGATTTGTGGGTTTGCTACAAC TCCTGTATGCGAGTACCAGGGGAACACGATTTCCGGGTATAAGCGGATGA TGGCCACTAAGGACAGTTTCAAAGCTTTAACCTCACAGAGCCCCATATC ACGACAAATAAGCTCGAATGGATTGACCCTGACGGCAATACTAGAGACCA TGTTAATTTGGTCTGAACAGGGATGTGAGCTTCCAGGACTTGTCCGACA ATCCCTGTAAAGTTGATCTGCATACACAGGCTATTGAGGGAGCTTGGGGC TCTGGGGTCGGCTTTACTCTTACTTGTACAGTTGGACTGACCGAATGTCC GAGCTTTATGACTAGCATAAAAGCGTGTGACCTGGCGATGTGTTATGGAA GCACTGTGACGAACCTTGCTCGAGGTAGCAACACAGTCAAGGTAGTAGG GAAAGGAGGGCACTCAGGAAGTAGTTTCAAATGCTGTCATGATACTGATT GTAGCTCTGAAGGCTTGCTCGCCTCTGCACCGCACCTGGAGCGCGTGAC AGGATTCACCCAGATCGATAGCGACAAAGTATATGATGACGGAGCTCCGC CATGCACCTTCAAGTGCTGGTTTACAAAAAGCGGAGAATGGCTGCTGGGC ATTCTGAATGGAAATTGGATTGTCGTGTTCTCGTGGTTCATCTTGATT TTGAGTATTATAATGTTTAGCGTCTTGTGCCACGCGCGGACATAAAAAA</p>	
	ACTGTG TGA	

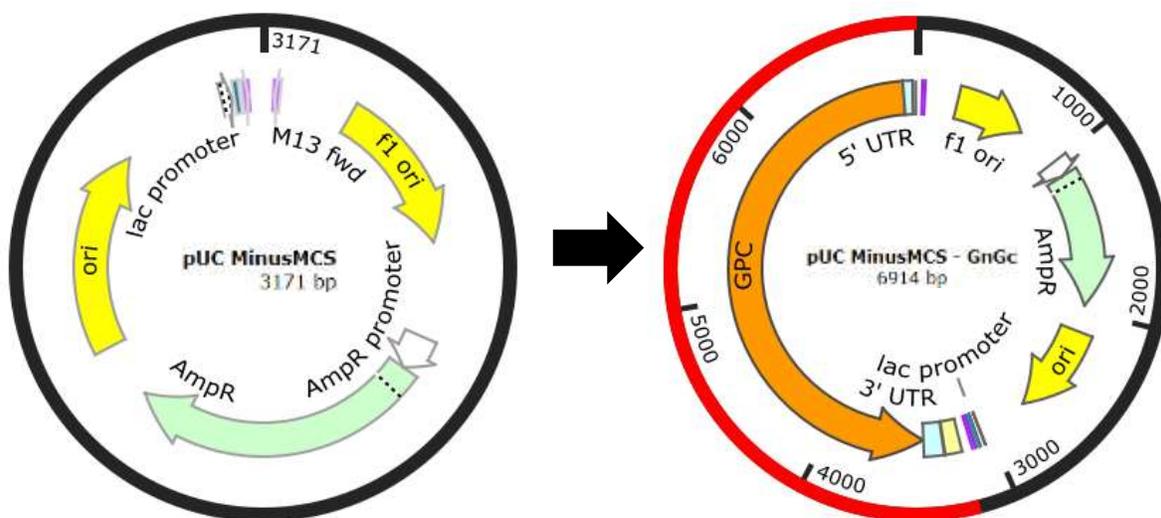
Dominio	Secuencia	Tamaño (pb)
3' UTR	TGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCTAGCTTCTTGCCCCTTGGGCCTC CCCCCAGCCCCTCCTCCCCTTCTGCACCCGTACCCCCGTGGTCTTTGAA TAAAGTCTGAGTGGGCGGC	119
Cola poli(A)	AA AA	100

Nota. Codón de inicio en verde, codón de parada en rojo y secuencia Kozak en negra.

La clonación de la unidad transcripcional GPC de 3743 pb en el vector Blue Heron pUC MinusMCS de 3171 pb se muestra en la Figura 6 y el resultado de la conformación del plásmido pUCMinusMCS – GnGc de 6914 pb se observa en la Figura 7.

Figura 6

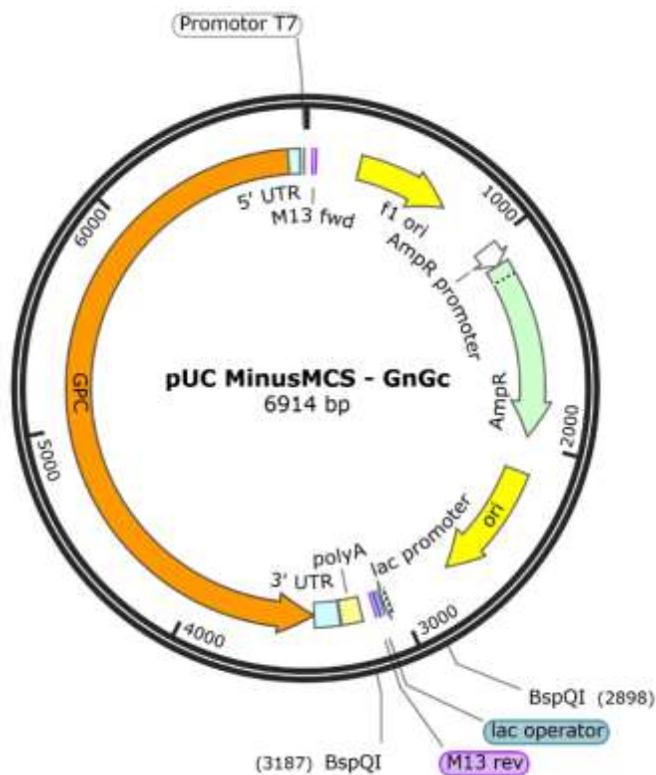
Clonación de la unidad transcripcional GPC en el vector pUC MinusMCS



Nota. Creado con SnapGene.

Figura 7

Plásmido pUC MinusMCS – GnGc para la expresión de ARN mensajero



Nota. Creado con SnapGene.

El vector Blue Heron pUC MinusMCS contenía el casete de expresión AmpR que codifica para la β -lactamasa, encargada de conferir resistencia a la ampicilina, carbenicilina y antibióticos relacionados, lo que es útil para amplificar el plásmido en *E. coli*. Además, incluía un origen de replicación del bacteriófago f1 (f1 ori), un origen de replicación de alto número de copias (ori), un promotor y operón lac de *E. coli*, y cebadores M13 forward y reverse.

Los sitios de restricción son importantes para la clonación y linealización del molde de ADN, por lo que se resumen las enzimas de restricción y los cortes que realizan en la Tabla 5. El sitio de restricción de BspQI se presentó dos veces en pUC MinusMCS – GnGc.

Tabla 5*Enzimas de restricción de pUC MinusMCS – GnGc*

Enzimas de restricción	Corte
BamHI	<pre> ▼ G G A T C C C C T A G G ▲ </pre>
MfeI	<pre> ▼ C A A T T G G T T A A C ▲ </pre>
BspQI	<pre> ▼ G C T C T T C N C G A G A A G N N N N ▲ </pre>
NotI	<pre> ▼ G C G G C C G C C G C C G G C G ▲ </pre>

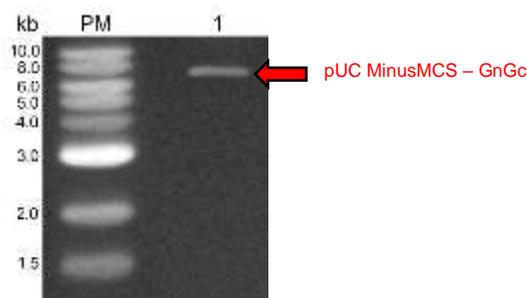
Nota. N es cualquier nucleótido.

Purificación de pUC MinusMCS – GnGc

El plásmido pUC MinusMCS – GnGc fue amplificado en *E. coli* para tener la cantidad necesaria de ADN que se requirió en los siguientes procesos. Tras ser purificado por lisis alcalina se cuantificó una concentración de 1,95 µg/µL de ADN plasmídico y una relación de la absorbancia a 260 y 280 nm de 1,926. Después de ser tratado con ARNasa A para eliminar la contaminación con ARN, la concentración del plásmido fue de 1,54 µg/µL y la relación 260/280 disminuyó a 1,923. Finalmente, tras ser purificado por columnas, pUC MinusMCS – GnGc obtuvo una concentración de 0,9 µg/µL. La electroforesis en gel de agarosa al 1% permitió determinar la presencia del plásmido purificado, que tenía un tamaño de 6.9 kb, así como verificar su integridad ya que se visualizó como una sola banda señalada en la Figura 8.

Figura 8

Electroforesis en gel de agarosa al 1%, purificación del plásmido pUC MinusMCS – GnGc



Nota. Carriles: PM, marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb; 1, plásmido purificado (flecha roja).

Digestión enzimática para verificar la identidad de pUC MinusMCS – GnGc

La digestión con las tres enzimas de restricción utilizadas dio como resultado bandas de diferente tamaño en el gel de electroforesis. La reacción 1 con *SacI* y *EcoRV* cortó el plásmido en 4460 pb y 2454 pb. La reacción 2 con *SacI* y *KpnI* generó bandas de 3677 pb y 3237 pb. Y la reacción 3 con *SacI* linealizó el plásmido de 6914 pb. Como se muestra en la Figura 9, se comprobó la adecuada digestión enzimática pues los tamaños corresponden con los cortes esperados y, por tanto, se verificó la identidad del plásmido pUC MinusMCS – GnGc.

Figura 9

Electroforesis en gel de agarosa al 1%, digestión enzimática de pUC MinusMCS – GnGc



Nota. Carriles: PM, marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb; 1, digestión del plásmido con

SacI y EcoRV; 2, digestión del plásmido con SacI y KpnI; 3, digestión del plásmido con SacI.

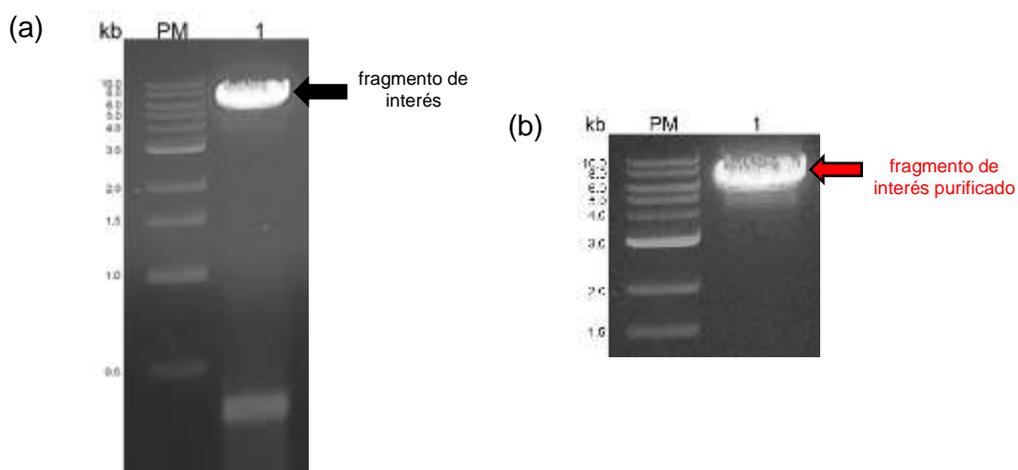
Linealización de pUC MinusMCS – GnGc

Una vez verificada la identidad del plásmido, se continuó con la linealización para que la plantilla de ADN se transcriba *in vitro* en el siguiente paso. La linealización de pUC MinusMCS – GnGc con BspQI generó dos fragmentos, de 6625 pb y 289 pb. En la Figura 10a se observan dos bandas, una se ubica debajo de 0,5 kb y la otra de mayor peso molecular en 6,6 kb aproximadamente.

En el fragmento de 6625 pb se encontraba la plantilla de ADN que expresa el ARNm de interés, por lo que se extrajo del gel la banda de 6.6 kb y se purificó. El resultado de este proceso se muestra en la Figura 10b, donde se observa una sola banda de 6,6 kb aproximadamente.

Figura 10

Electroforesis en gel de agarosa al 1%, linealización de pUC MinusMCS – GnGc con BspQI

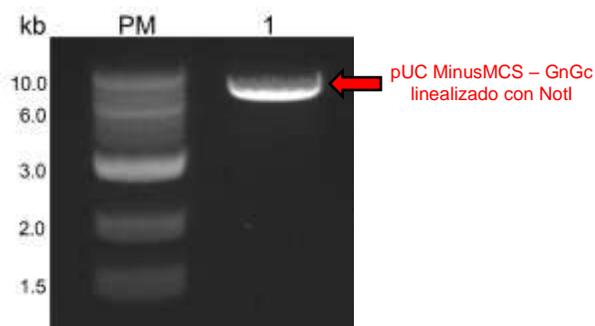


Nota. Carriles: PM, marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb; (a) 1, plásmido cortado con BspQI donde se observa el fragmento de interés (flecha negra); (b) 1, fragmento de interés purificado después de la linealización del plásmido con BspQI (flecha roja).

En cambio, la linealización de pUC MinusMCS – GnGc con NotI generó un fragmento de 6.9 kb, ya que el plásmido tiene un solo sitio de restricción para esta enzima. En la Figura 11 se muestra una sola banda definida que indica la linealización completa del ADN plasmídico.

Figura 11

Electroforesis en gel de agarosa al 1%, linealización de pUC MinusMCS – GnGc con NotI



Nota. Carriles: PM, marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb; 1, plásmido linealizado con NotI (flecha roja).

La electroforesis en gel de agarosa al 1% permitió comprobar la linealización del plásmido con ambas enzimas. Se obtuvo una concentración de ADN de 0,14 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ después de linealizar pUC MinusMCS – GnGc con BspQI y 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ cuando se utilizó NotI. Por lo que linealizar el plásmido de ADN con NotI brindó mejores resultados.

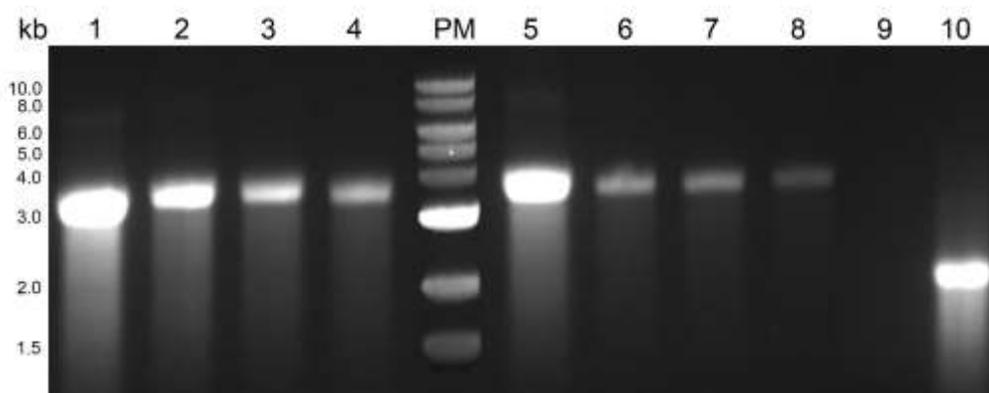
Estandarización de la transcripción *in vitro* del ARNm

Para la transcripción *in vitro* del ARNm se decidió utilizar las plantillas de ADN resultantes de las dos linealizaciones y escoger la mejor para el proceso del capping enzimático. Desde el promotor T7 hasta la cola de poli(A), el transcrito tenía un tamaño de 3718 pb. La electroforesis en gel de agarosa al 1% permitió determinar la presencia del ARNm después de la IVT de ambas plantillas de ADN. Como se indica en la Figura 12, se visualizó una banda de aproximadamente 3,7 kb en las dos muestras y sus respectivas diluciones

seriadas (carriles 1-8), así como una franja de menor peso molecular en cada banda que indicó que parte del ARNm transcrito se degradó. El control positivo (carril 10) correspondía a un transcrito de FLuc que codifica a luciferasa y tenía un tamaño de 1,8 kb.

Figura 12

Electroforesis en gel de agarosa al 1%, ARNm transcrito in vitro



Nota. Carriles: 1, ARNm transcrito de la plantilla linealizada con BspQI; 2, 3 y 4, diluciones seriadas de 1; PM, marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb; 5, ARNm transcrito de la plantilla linealizada con NotI; 6, 7 y 8, diluciones seriadas de 5; 9, control negativo (agua); 10, control positivo (FLuc). En todas las muestras de ARNm se presenta degradación.

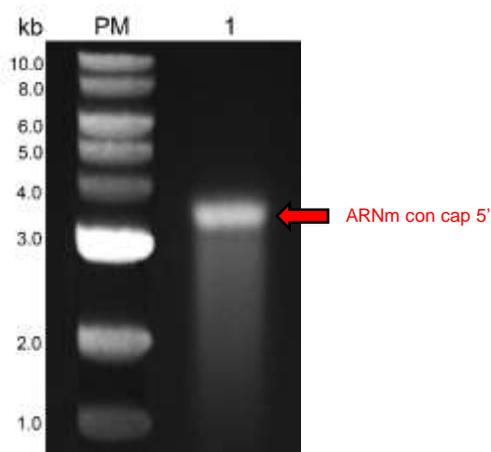
La concentración de ARNm transcrito a partir de la plantilla linealizada con BspQI fue 1,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se cuantificó por espectrofotometría 1,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para el transcrito de la plantilla linealizada con NotI. Con BspQI se obtuvo una mayor cantidad de ARNm, sin embargo, se presenta una mayor degradación en comparación con el ARNm transcrito de la plantilla linealizada con NotI, por lo que el proceso del capping enzimático se realizó con este ARNm.

En un paso postranscripcional se agregó la estructura cap 5' al ARNm, utilizando la enzima capping del virus vaccinia para generar la estructura cap0 y la 2'-O-metil-transferasa para generar la estructura cap1. Tras la electroforesis en gel de agarosa al 1% se visualizó un tamaño de banda correspondiente a 3,7 kb y una franja de menor peso molecular (Figura 13),

lo que indicó la presencia del ARNm con cap 5' y degradación de una parte de este. La concentración final del ARNm fue de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Figura 13

Electroforesis en gel de agarosa al 1%, ARNm con cap 5'



Nota. Carriles: PM, marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb; 1, ARNm con cap 5' (flecha roja).

Establecimiento de las líneas celulares HEK293A y HCT116

Se descongelaron y mantuvieron las líneas celulares HEK293A y HCT116 mediante pases al alcanzarse una confluencia celular del 80%. Posteriormente se utilizaron las células para transfectar el ARNm sintetizado y realizar los respectivos análisis.

Transfección del ARNm en las líneas celulares HEK293A y HCT116

Evaluación de la viabilidad celular

La evaluación de la viabilidad celular mediante el ensayo MTT permitió estimar la toxicidad que provocan los tratamientos con ARNm-PEI y ARNm-Lipofectamina. Las concentraciones probadas para ambos tratamientos fueron 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0,25

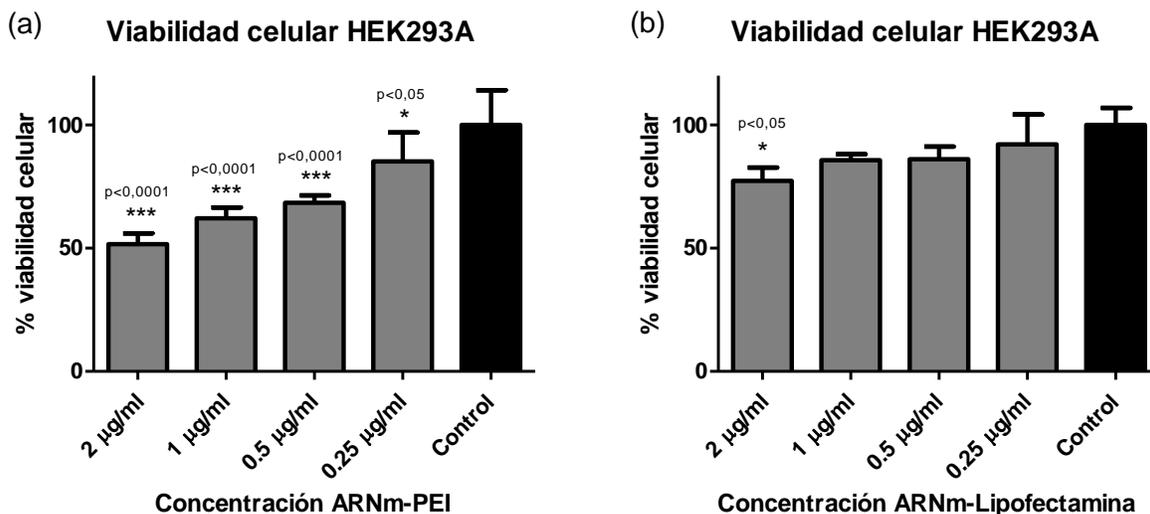
$\mu\text{g/mL}$. Como control negativo se utilizó medio de cultivo sin tratamiento. Las absorbancias medidas al final del ensayo indicaban la actividad metabólica celular y por tanto la viabilidad. Las concentraciones de los tratamientos fueron probadas por triplicado y normalizadas para que queden expresadas como porcentaje de viabilidad celular. Se graficó el promedio y la desviación estándar para la línea celular HEK293A (Figura 14) y HCT116 (Figura 15). Se aplicaron análisis estadísticos para identificar las concentraciones de ARNm-PEI y ARNm-Lipofectamina que disminúan la viabilidad celular de forma significativa.

En la línea celular HEK293A las cuatro concentraciones de ARNm-PEI redujeron significativamente la viabilidad de las células ya que presentaron valores de p menores a 0,05. Como se observa en la Figura 14a, las tres primeras concentraciones de 2, 1 y 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de ARNm-PEI obtuvieron un valor de $p < 0,0001$ (***) y disminuyeron la viabilidad celular en un 48,39%, 37,89% y 31,60%, respectivamente. La concentración más baja de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ mostró un $p < 0,05$ (*) y redujo en un 14,77% la viabilidad, por lo que la transfección de ARNm usando polietilenimina resulta tóxico para las células.

Mientras que, como indica la Figura 14b, tres de las cuatro concentraciones de ARNm-Lipofectamina no afectaron a la viabilidad de las células pues $p > 0,05$. Únicamente la concentración de 2 $\mu\text{g/mL}$ de ARNm-Lipofectamina afectó de forma significativa a la viabilidad en un 22,64% y presentó un valor $p < 0,05$ (*). Adicionalmente se compararon los resultados entre el tratamiento de ARNm-PEI y ARNm-Lipofectamina y se determinó que, si hay diferencia significativa para la viabilidad celular utilizar PEI o Lipofectamina durante la transfección de ARNm, pues el valor de p fue 0,0079.

Figura 14

Viabilidad en células HEK293A a diferentes concentraciones entre ARNm-PEI y ARNm-Lipofectamina



Nota. (a) Tratamiento con ARNm-PEI. (b) Tratamiento con ARNm-Lipofectamina. El asterisco indica las concentraciones que afectan a la viabilidad celular de forma significativa ($p < 0,05$).

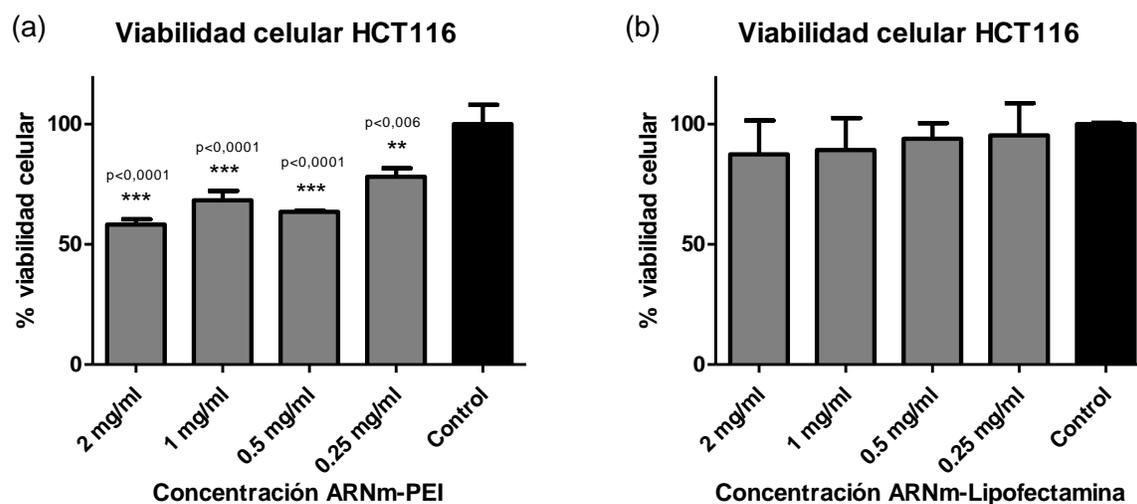
Creado con GraphPad Prism 9, analizado por ANOVA de una vía y una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni.

De forma similar, en la línea celular HCT116 las cuatro concentraciones de ARNm-PEI redujeron significativamente la viabilidad de las células ya que presentaron valores de p menores a 0,05. Como se observa en la Figura 15a, las tres primeras concentraciones de 2, 1 y 0,5 µg/mL de ARNm-PEI obtuvieron un valor de $p < 0,0001$ (***) y disminuyeron la viabilidad celular en un 41,70%, 31,69% y 36,40%, respectivamente. La concentración más baja de 0,25 µg/mL mostró un $p < 0,006$ (**) y redujo en un 21,83% la viabilidad, por lo que la transfección de ARNm usando polietilenimina resulta tóxica para las células. Mientras que, como indica la Figura 15b, las cuatro concentraciones de ARNm-Lipofectamina no afectaron a la viabilidad de las células pues $p > 0,05$. Los resultados de la comparación entre el tratamiento de ARNm-PEI y

ARNm-Lipofectamina indicaron que, si hay diferencia significativa para la viabilidad celular utilizar PEI o Lipofectamina durante la transfección de ARNm, pues el valor de P fue 0,0413.

Figura 15

Viabilidad en células HCT116 a diferentes concentraciones entre ARNm-PEI y ARNm-Lipofectamina



Nota. (a) Tratamiento con ARNm-PEI. (b) Tratamiento con ARNm-Lipofectamina. El asterisco indica las concentraciones que afectan a la viabilidad celular de forma significativa ($p < 0,05$).

Creado con GraphPad Prism 9, analizado por ANOVA de una vía y una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni.

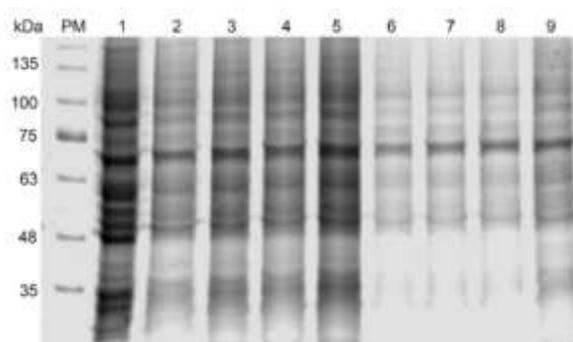
Análisis de la expresión del antígeno

Después de la transfección de las células con el ARNm se esperaba la expresión de las glicoproteínas de superficie, Gn y Gc, de 80,5 y 57 kDa respectivamente. Por lo que se realizó un análisis SDS-PAGE al 10% bajo condiciones reductoras para determinar la presencia de las proteínas. La transfección con ARNm-PEI y ARNm-Lipofectamina se hizo por triplicado, denominado como A, B y C, en las líneas celulares HEK293A (Figura 16) y HCT116 (Figura

17). Como se observa en ambos geles, no fue posible identificar la presencia de Gn/Gc ya que se presentaron demasiadas bandas y no se podía diferenciar las bandas del tamaño deseado, ni en el control positivo ni en las muestras. Por lo que se debe realizar un Western Blot para que se reconozcan específicamente las proteínas.

Figura 16

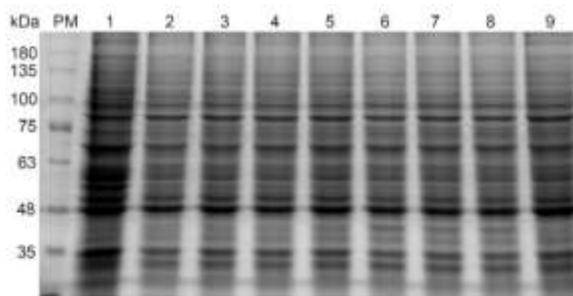
Análisis mediante SDS-PAGE al 10% denaturante de la expresión del antígeno Gn/Gc en HEK293A



Nota. Carriles: PM, marcador de peso molecular AccuRuler RGB PLUS 10-245 kDa; 1, control positivo (Gn/Gc); 2, ARNm-PEI A; 3, ARNm-PEI B; 4, ARNm-PEI C; 5, control negativo PEI; 6, ARNm-Lipofectamina A; 7, ARNm-Lipofectamina B; 8, ARNm-Lipofectamina C; 9, control negativo Lipofectamina.

Figura 17

Análisis mediante SDS-PAGE al 10% denaturante de la expresión del antígeno Gn/Gc en HCT116



Nota. Carriles: PM, marcador de peso molecular AccuRuler RGB PLUS 10-245 kDa; 1, control

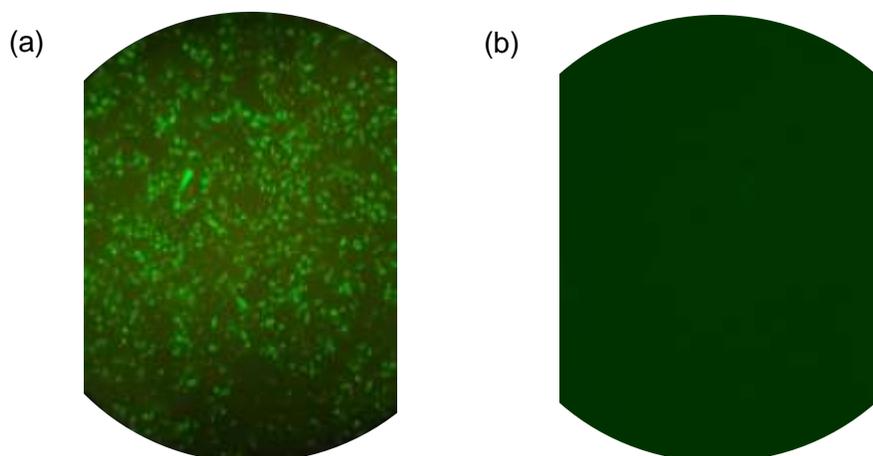
positivo (Gn/Gc); 2, ARNm-PEI A; 3, ARNm-PEI B; 4, ARNm-PEI C; 5, control negativo PEI; 6, ARNm-Lipofectamina A; 7, ARNm-Lipofectamina B; 8, ARNm-Lipofectamina C; 9, control negativo Lipofectamina.

Para realizar el Western Blot se necesita un anticuerpo anti-Gn/Gc que se una con las proteínas de interés. Debido a que no se podía adquirir el anticuerpo comercial por discontinuación del producto, se evaluaron varios hibridomas productoras de anticuerpos anti-Gn/Gc donados por el Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción, Chile.

Se pudieron obtener las glicoproteínas Gn/Gc tras la transfección de células HEK293A con los vectores de ADN pEntry GPC y pEGFP. La Figura 18 muestra las células transfectadas que expresan la proteína verde fluorescente como control de la expresión de Gn/Gc. Las proteínas obtenidas sirvieron como control para determinar la especificidad de los anticuerpos anti-Gn/Gc producidos por hibridomas.

Figura 18

Transfección de pEntry GPC y pEGFP en células HEK293A

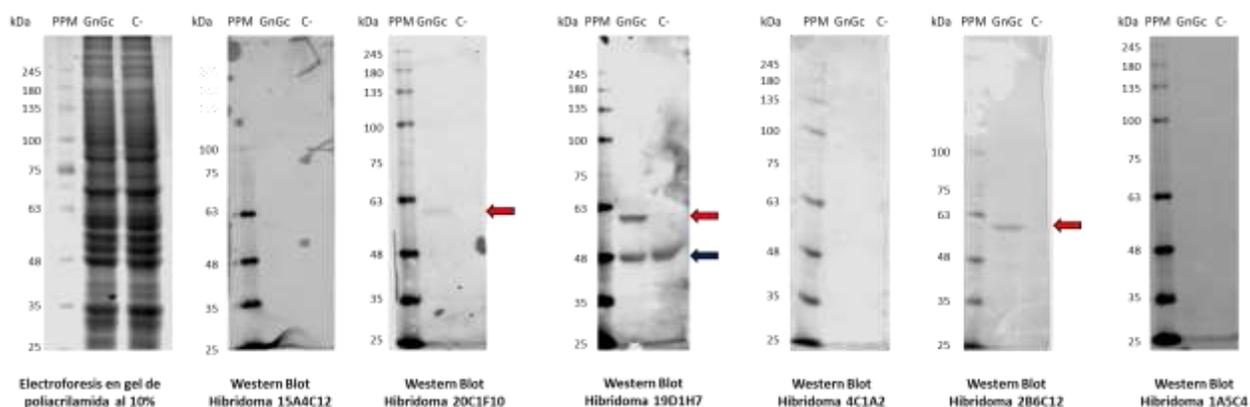


Nota. (a) HEK293A transfectadas. (b) HEK293A sin transfección (control negativo). Observado bajo microscopio invertido de fluorescencia (10X).

Los hibridomas probados fueron 15A4C12, 20C1F10, 19D1H7, 4C1A2, 2B6C12 y 1A5C4. Como se muestra en la Figura 19, con los anticuerpos obtenidos del primer, cuarto y sexto hibridoma no se detectó señal tras realizar el Western Blot utilizando la proteína Gn/Gc como muestra, por tanto, no se produjeron anticuerpos que se unan específicamente con el antígeno de interés. Con los anticuerpos del tercer hibridoma se detectaron dos señales, una específica para Gc (57 kDa) ya que el peso aproximadamente era de 60 kDa y una señal inespecífica a 48 kDa. Por último, con los anticuerpos del segundo y quinto hibridoma se detectó una señal específica para Gc a los 60 kDa aproximadamente. Sin embargo, la señal que se genera por la unión de anti-Gn/Gc y Gn/Gc es débil, por lo que la cantidad de anticuerpos es baja y no se pueden utilizar para detectar el antígeno producido por el ARNm.

Figura 19

Análisis mediante SDS-PAGE al 10% denaturante y Western Blot de hibridomas productoras de anti-Gn/Gc



Nota. Carril PPM, marcador de peso molecular AccuRuler RGB PLUS 10-245 kDa; Carril GnGc, glicoproteínas Gn/Gc; Carril C-, control negativo Gn/Gc. Las flechas rojas indican que se detectó señal del anti-Gn/Gc y la flecha negra que se detectó una señal inespecífica.

Los resultados de este trabajo de investigación demostraron que incluir elementos estructurales como la caperuza 5', las regiones no traducidas 5' y 3' y la cola de poli(A) en la unidad transcripcional favoreció la estabilidad y expresión del ARNm. La estandarización de la transcripción *in vitro* del ARNm se logró partiendo de una plantilla de ADN totalmente lineal y eliminando en el proceso proteínas, ARN y ADN contaminante, ARNasas, nucleótidos libres y sales que podían interferir y degradar el ARNm, obteniendo 0,5 µg/µL de ARNm a partir de 0,2 µg/µL de ADN. Finalmente, la transfección del ARNm en las líneas celulares HEK293A y HCT116 indicó que la lipofectamina brinda mejores resultados de transfección.

Capítulo V: Discusión

El campo de las vacunas de ARN ha evolucionado enormemente (Karam & Daoud, 2022). La rapidez y eficacia para generar prototipos de vacunas de ARNm se comprobó cuando Moderna lo hizo en menos de diez semanas desde que la secuencia del genoma del virus SARS-CoV-2 estuvo disponible en internet (Dolgin, 2021). Hasta el momento han sido autorizadas y ampliamente utilizadas dos vacunas de ARNm contra el COVID-19, de Moderna y Pfizer/BioNTech, que se caracterizan por su ARN modificado y su formulación en nanopartículas lipídicas, sin embargo, los principales inconvenientes que limitan la viabilidad clínica de esta tecnología son la escasa estabilidad y la limitada eficacia de transfección (Karam & Daoud, 2022). Por lo que el principal reto es optimizar la estabilidad del ARNm y los sistemas de administración (Liang et al., 2021)

La modularización del diseño de la unidad transcripcional es una estrategia prometedora para pasar a su uso clínico (Xu et al., 2020). La reacción de la transcripción *in vitro* para generar ARNm generalmente se basa en las ARN polimerasas de bacteriófagos T7, SP6 o T3, que catalizan la síntesis del ARNm diana a partir del molde de ADN (Rosa et al., 2021). Varios estudios han sintetizado ARNm utilizando una reacción de transcripción mediada por la ARN polimerasa T7 a partir de una plantilla de ADN linealizada del plásmido (Corbett et al., 2020; DeGroot et al., 2018; Li et al., 2016; J. Liu et al., 2022; Moradian et al., 2020; W. Sun et al., 2021; N.-N. Zhang et al., 2020) Otros han utilizado la misma polimerasa, pero han obtenido ARNm a partir de productos de PCR (Avci-Adali et al., 2014; Jia et al., 2020) De forma similar al primer caso, en este trabajo se incorporó un promotor T7 en el plásmido de ADN pUC MinusMCS – GnGc, con el fin de sintetizar ARNm después de su linealización.

En las células eucariotas la mayor parte de la degradación del ARNm comienza en la cap 5' y la cola de poli(A) 3' (Liang et al., 2021). La estructura cap 1 hasta el momento se ha descrito solo en ARNm eucariotas y es la más usada para las vacunas ya que puede utilizarse

como señal de ARN propio, para evitar el reconocimiento de los sensores inmunitarios innatos y mejorar la eficacia de la traducción *in vivo* (Fang et al., 2022; C. Zhang et al., 2019). En un paso postranscripcional se incorporó esta estructura al ARNm sintetizado que expresa la proteína GnGc. De forma similar a la vacuna ARNm-1273 de Moderna contra el COVID-19 que emplea el mismo procedimiento con la misma enzima capping Vaccinia (Fang et al., 2022) y a otros estudios (Corbett et al., 2020; W. Sun et al., 2021).

En las células de mamíferos los ARNm suelen contener entre 100 y 250 residuos de adenosina en la cola de poli(A) (Fang et al., 2022). Un estudio de transcripción *in vitro* de ARNm utilizó una secuencia de poliadenina de 128 bases (Moradian et al., 2020) y en otro se incluyeron 120 bases (Avci-Adali et al., 2014) La transfección con una cola larga de poli(A) de 100 residuos, comparada con una de 64 adenosinas, se probó con un ARNm codificador de luciferasa en las líneas celulares JawsII, HepG2, HeLa y se determinó una mejora sustancial en la expresión proteica en todos los tipos celulares, aunque la magnitud del aumento dependía del tipo de célula (Mockey et al., 2006). Lo que se correlaciona con lo realizado ya que se agregó una cola de poli(A) de 100 nucleótidos de longitud en la unidad transcripcional para favorecer la estabilidad de la molécula y evitar su degradación.

Durante el diseño de la unidad transcripcional se incluyeron las regiones no traducidas (UTR) en 5' y 3', al igual que la secuencia Kozak, incluida entre la 5' UTR y el inicio del ORF, para aumentar la estabilidad del ARNm y su traducción. En varios estudios se indica que el marco abierto de lectura abierto fue flanqueado por secuencias UTR 5' y 3' (Corbett et al., 2020; J. Liu et al., 2022; W. Sun et al., 2021). En este trabajo la secuencia 3' UTR utilizada provenía de la α -globina humana y en 5' UTR se incluía la secuencia Kozak, similar a lo realizado por (DeGroot et al., 2018). Mientras que otras investigaciones utilizan 3' UTR de β -globina humana (Moradian et al., 2020), 3' UTR de β -globina de ratón (Jarzebska et al., 2021) o una combinación de β -globina 5' UTR y α -globina 3' UTR (Ahammad & Lira, 2020).

Por otro lado, los fragmentos de ADN resultantes de digestiones con endonucleasas de restricción están mezclados con enzimas, sales y otros contaminantes que pueden inhibir las reacciones posteriores, por lo que es necesario purificar los fragmentos de ADN de interés (Downey, 2003), como se realizó después de la linealización de pUC MinusMCS–GnGc con BspQI y NotI. Similar a la linealización con BspQI y su posterior purificación, (Moradian et al., 2020) linealizaron la plantilla de ADN y purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa utilizando un kit de extracción en gel. Mientras que otros autores indican una purificación del plásmido mediante centrifugación en gradiente de cloruro de cesio y bromuro de etidio (DeGroot et al., 2018).

Se conoce que el ARNm se ve amenazado por la rápida degradación por ribonucleasas extracelulares ubicuas antes de poder ser captado por las células (Schlake et al., 2012). Es una molécula inestable por la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 2' del azúcar ribosa, que lo vuelve sensible a las nucleasas ambientales y biológicas que rompen su enlace fosfodiéster por transesterificación intramolecular (Karam & Daoud, 2022). Esto explica la degradación del ARNm observada dentro de un corto periodo de tiempo después de la transcripción *in vitro* y el capping enzimático. Se requieren estudios de estabilidad para conocer en qué condiciones el ARNm que codifica para las glicoproteínas Gn/Gc se degrada.

A medida que continúan los estudios aparecen nuevas estrategias para mejorar la síntesis de ARNm por transcripción *in vitro* (Karam & Daoud, 2022). Es importante purificar el ARNm sintético pues la contaminación con ARN de doble cadena, generado por actividades aberrantes de la ARN polimerasa, causa la degradación del ARNm y la inhibición de la traducción (C. Zhang et al., 2019). En este caso, el ARNm se purificó dos veces con el kit de limpieza de transcripción MEGAclean, después de la IVT y al terminar el capping enzimático, lo que contribuiría a evitar su degradación. Otros estudios utilizaron diferentes técnicas para purificar el ARNm sintetizado, como purificación por afinidad con oligo-dT (Corbett et al., 2020),

precipitación con fenol/cloroformo (Li et al., 2016) y precipitación con cloruro de litio (Moradian et al., 2020).

Durante la IVT se utilizó el inhibidor de ARNasa RiboLock para evitar la degradación del ARNm, tal como lo realizaron (Avci-Adali et al., 2014). Otras medidas que se aplicaron para evitar la pérdida del ARNm incluyeron utilizar agua tratada con DEPC, usar siempre guantes y cambiarlos cuando entren en contacto con cabello, piel o suciedad, utilizar material libre de ARNasas y exclusivo para ARN, autoclavar puntas con filtro y microtubos, trabajar en cámara de flujo vertical y con mascarilla, limpiar a fondo los instrumentos y superficies, y por último mantener el ARN en hielo durante el trabajo y almacenar a -80°C . La mayoría de estas medidas también son descritas por (Green & Sambrook, 2019).

Uno de los problemas de aplicación más difíciles en el desarrollo de vacunas de ARNm es la administración de la molécula a un número suficiente de células con niveles de traducción suficientemente altos, por lo que se necesitan sistemas de administración altamente específicos y eficientes (Xu et al., 2020). Los liposomas y los lipoplejos que contienen sólo uno o dos componentes lipídicos adolecen de baja estabilidad y falta de reproducibilidad en su producción, los primeros presentan baja eficacia de encapsulación de oligonucleótidos y los segundos inestabilidad de las partículas y amplia distribución de tamaños, lo que determina su poco éxito en la aplicación *in vivo* (Pilkington et al., 2021). Para transfectar el ARNm de interés en este trabajo se utilizaron los reactivos de transfección PEI y Lipofectamina.

La polietilenimina (PEI) es un polímero que atrae y transporta fácilmente ácidos nucleicos por el efecto de esponja protónica que, además facilita el escape endosomal (Bouazzaoui et al., 2021). Los sistemas de PEI se han aplicado como una estrategia para administrar ARNm a células dendríticas de ratón DC2.4 (Zhao et al., 2016) y como vacunas por vía intranasal (Li et al., 2016). De hecho, es el control estándar de oro en la transfección de genes. Sin embargo, la potencial toxicidad asociada a su elevado peso molecular y falta de

degradabilidad impide su aplicación más amplia (Xiong et al., 2018). Además, se ha comprobado que a medida que se aumenta su peso molecular, aumenta la eficiencia de transfección, pero también su toxicidad debido a la alta densidad de carga catiónica (Fang et al., 2022; Liang et al., 2021). Esto se relaciona con los resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad celular, que indicaron que todas las concentraciones del tratamiento con ARNm-PEI disminuyeron significativamente la viabilidad celular y por tanto son citotóxicas.

Al contrario, la mayoría de las concentraciones del tratamiento con ARNm-Lipofectamina no causaron ningún efecto significativo en la viabilidad de las células. La lipofectamina se ha utilizado ampliamente para la transfección *in vitro*, es relativamente tóxica, y la mayor preocupación es su farmacocinética deficiente (Xiong et al., 2018) Sin embargo, varios estudios han reportado su uso para la transfección de ARNm en células, tanto de Lipofectamina 2000 (Avci-Adali et al., 2014; W. Sun et al., 2021) y Lipofectamina 3000 (N.-N. Zhang et al., 2020), como del novedoso reactivo Lipofectamina MessengerMAX exclusivo para esta aplicación de ARN (Chen et al., 2018; DeGroot et al., 2018; Jarzebska et al., 2021; Jia et al., 2020; J. Liu et al., 2022; Moradian et al., 2020).

Las nanopartículas lipídicas con buena biocompatibilidad son una de las novedades que ha dictado el éxito de las vacunas de ARNm, pues mejoran sustancialmente la estabilidad del ARNm y facilitan la eficacia de su transfección *in vivo* (Pan et al., 2021). Por lo que podría adoptarse este enfoque en vez de utilizar PEI y Lipofectamina.

La expresión transitoria del ARNm en las células suele ser baja debido a su rápida degradación por endonucleasas localizadas citoplasmáticamente (Bouazzaoui et al., 2021) De forma que la expresión de antígenos también es transitoria y es posible que no se encuentren rastros después de 2-3 días (Rosa et al., 2021). Después de la transfección con el ARNm se esperaron 2 días para analizar la expresión del antígeno, lo que puede ser un problema por las

características transitorias descritas. Es fundamental conocer el modo de acción con el que el ARNm sintético se transfecta en células *in vivo* (Pilkington et al., 2021).

Para la transfección del ARNm en este trabajo se utilizaron las líneas celulares HEK293A y HCT116. La línea celular HEK293 se ha utilizado para transfectar ARNm modificado con estabilidad aumentada y potencial de activación inmunitaria reducida, mostrando la mayor expresión de la proteína de interés en comparación con fibroblastos BJ y células endoteliales (Avci-Adali et al., 2014). En otro estudio igualmente la transfección de ARNm en HEK293 fue exitosa y se detectó una eficiencia de transfección del 80-90% y una viabilidad celular del 60% después de 24 h de la transfección (Ejeskär et al., 2006). No se encontraron estudios que utilicen la línea celular HCT116 para la transfección de ARNm, sin embargo, un kit de transfección de HCT116 indica que cuenta con un reactivo a base de lípidos catiónicos que es una formulación patentada optimizada para la transfección de ADN y ARN en células HCT116 (Altogen Biosystems, s/f).

A pesar de que no se logró obtener un anticuerpo anti-Gn/Gc lo suficientemente eficaz para analizar la expresión del antígeno, la tecnología del hibridoma es uno de los métodos más utilizados para producir anticuerpos sensibles y específicos ya que una vez que las células de hibridoma se estabilizan pueden ofrecer una producción ilimitada de anticuerpos homogeneizados (Mitra & Tomar, 2021). Por lo que se requiere la optimización de este proceso para obtener anticuerpos lo suficientemente específicos para Gn/Gc y poder determinar la expresión del ARNm por la técnica Western Blot.

Finalmente, agregar optimizaciones adicionales en la producción de vacunas de ARNm, como la modificación de nucleósidos, el uso de nanotransportadores lipídicos o andamiajes de ingeniería tisular (Karam & Daoud, 2022) pueden hacer que esta plataforma sea una solución clínicamente viable. Actualmente la investigación en ARNm está recibiendo una gran financiación en todo el mundo (Karam & Daoud, 2022). Continúa en desarrollo la optimización

de la secuencia del ARNm codificante, la mejora de la composición y construcción de las vacunas, el aumento de la capacidad productiva del ARNm, el cribado de moléculas portadoras y adyuvantes, la demostración de los mecanismos inmunológicos del ARNm sintético y la elección de la vía de administración, pero el potencial para convertirse en el patrón vacunal preferido se ha demostrado ampliamente (Xu et al., 2020)x

Un concepto simple puede tener un camino difícil hacia la realidad y la tecnología puede no ser totalmente genérica (M. A. Liu, 2019), como se demostró durante el desarrollo de este trabajo. No obstante, el desarrollo exitoso de esta plataforma vacunal fortalecerá notablemente la capacidad para reaccionar y controlar las enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes en animales (Xu et al., 2020), por lo que continuar con su investigación y desarrollo es clave.

Conclusiones

- El correcto diseño de la unidad transcripcional simulando las características del ARNm eucariota maduro y aplicando optimizaciones a los elementos estructurales básicos mejoran la expresión del ARN mensajero.
- La estandarización de las condiciones de la transcripción *in vitro*, mediante la purificación de la molécula y la eliminación de ARNasas, contribuye a evitar la degradación del ARN mensajero y aumentar su estabilidad.
- La transfección del ARN mensajero con PEI resulta tóxico para las células, mientras que su administración con Lipofectamina no tiene efectos significativos en la viabilidad celular.

Recomendaciones

- Se recomienda tomar las precauciones necesarias durante el trabajo con el ARN para evitar su contaminación y degradación, preferiblemente tener un lugar de trabajo y material exclusivo para su manipulación.
- Se sugiere eliminar completamente el suero fetal bovino antes de la transfección y el análisis de la expresión del antígeno para que no exista interferencia.
- Se recomienda probar la transfección del ARNm transcrito *in vitro* con nanopartículas lipídicas y nucleósidos modificados para evitar su degradación e incrementar la eficacia de traducción.
- Se sugiere no utilizar PEI como reactivo de transfección de ARN mensajero por su alta toxicidad para las células de mamíferos.

Bibliografía

- Ahammad, I., & Lira, S. S. (2020). Designing a novel mRNA vaccine against SARS-CoV-2: An immunoinformatics approach. *International Journal of Biological Macromolecules*, *162*, 820–837. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.213>
- Altogen Biosystems. (s/f). HCT116 Transfection Protocol (Kit for Colon Carcinoma Cells, CCL-247). En *Altogen Labs*. Altogen Labs.
https://altogen.com/HCT116_Transfection_Protocol.pdf
- Ambion. (2012). *MEGAclear Kit - Purification for Large Scale Transcription Reactions*.
- Andersen, K. G., Rambaut, A., Lipkin, W. I., Holmes, E. C., & Garry, R. F. (2020). The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine*, *26*(4), 450–452. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>
- Avci-Adali, M., Behring, A., Keller, T., Krajewski, S., Schlensak, C., & Wendel, H. P. (2014). Optimized conditions for successful transfection of human endothelial cells with in vitro synthesized and modified mRNA for induction of protein expression. *Journal of Biological Engineering*, *8*, 8. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-8-8>
- Baden, L. R., El Sahly, H. M., Essink, B., Kotloff, K., Frey, S., Novak, R., Diemert, D., Spector, S. A., Rouphael, N., Creech, C. B., McGettigan, J., Khetan, S., Segall, N., Solis, J., Brosz, A., Fierro, C., Schwartz, H., Neuzil, K., Corey, L., ... Zaks, T. (2021). Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *New England Journal of Medicine*, *384*(5), 403–416. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035389>
- Bahuguna, A., Khan, I., Bajpai, V. K., & Kang, S. C. (2017). MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, *12*(2), 115–118.

- Barratt, A. S., Rich, K. M., Eze, J. I., Porphyre, T., Gunn, G. J., & Stott, A. W. (2019). Framework for Estimating Indirect Costs in Animal Health Using Time Series Analysis. *Frontiers in Veterinary Science*, 6.
- Beaudoin, C. A., Bartas, M., Volná, A., Pečinka, P., & Blundell, T. L. (2022). Are There Hidden Genes in DNA/RNA Vaccines? *Frontiers in Immunology*, 13.
- Bergman, P. J., Camps-Palau, M. A., McKnight, J. A., Leibman, N. F., Craft, D. M., Leung, C., Liao, J., Riviere, I., Sadelain, M., Hohenhaus, A. E., Gregor, P., Houghton, A. N., Perales, M. A., & Wolchok, J. D. (2006). Development of a xenogeneic DNA vaccine program for canine malignant melanoma at the Animal Medical Center. *Vaccine*, 24(21), 4582–4585. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.08.027>
- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523. <https://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513>
- Boseret, G., Losson, B., Mainil, J. G., Thiry, E., & Saegerman, C. (2013). Zoonoses in pet birds: review and perspectives. *Veterinary Research*, 44(1), 36. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-36>
- Bouazzaoui, A., Abdellatif, A. A. H., Al-Allaf, F. A., Bogari, N. M., Al-Dehlawi, S., & Qari, S. H. (2021). Strategies for Vaccination: Conventional Vaccine Approaches Versus New-Generation Strategies in Combination with Adjuvants. *Pharmaceutics*, 13(2), 140. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020140>
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., & Behr, J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16), 7297–7301.

Brenner, S., Jacob, F., & Meselson, M. (1961). An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature*, *190*, 576–581.

Burnette, W. N. (1981). “Western blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, *112*(2), 195–203. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90281-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90281-5)

Cánepa, C., Imperiale, J. C., Berini, C. A., Lewicki, M., Sosnik, A., & Biglione, M. M. (2017). Development of a Drug Delivery System Based on Chitosan Nanoparticles for Oral Administration of Interferon- α . *Biomacromolecules*, *18*(10), 3302–3309. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00959>

Chen, R., Zhang, H., Yan, J., & Bryers, J. D. (2018). Scaffold-mediated delivery for non-viral mRNA vaccines. *Gene therapy*, *25*(8), 556–567. <https://doi.org/10.1038/s41434-018-0040-9>

Corbett, K. S., Edwards, D. K., Leist, S. R., Abiona, O. M., Boyoglu-Barnum, S., Gillespie, R. A., Himansu, S., Schäfer, A., Ziwawo, C. T., DiPiazza, A. T., Dinnon, K. H., Elbashir, S. M., Shaw, C. A., Woods, A., Fritch, E. J., Martinez, D. R., Bock, K. W., Minai, M., Nagata, B. M., ... Graham, B. S. (2020). SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. *Nature*, *586*(7830), 567–571. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2622-0>

Davidson, A. H., Traub-Dargatz, J. L., Rodeheaver, R. M., Ostlund, E. N., Pedersen, D. D., Moorhead, R. G., Stricklin, J. B., Dewell, R. D., Roach, S. D., Long, R. E., Albers, S. J., Callan, R. J., & Salman, M. D. (2005). Immunologic responses to West Nile virus in vaccinated and clinically affected horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *226*(2), 240–245. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.226.240>

- DeGroot, D. E., Swank, A., Thomas, R. S., Strynar, M., Lee, M.-Y., Carmichael, P. L., & Simmons, S. O. (2018). mRNA transfection retrofits cell-based assays with xenobiotic metabolism. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, *92*, 77–94.
<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2018.03.002>
- Dimitriadis, G. J. (1978). Translation of rabbit globin mRNA introduced by liposomes into mouse lymphocytes. *Nature*, *274*(5674), 923–924. <https://doi.org/10.1038/274923a0>
- Dolgin, E. (2015). Business: The billion-dollar biotech. *Nature*, *522*(7554), 26–28.
<https://doi.org/10.1038/522026a>
- Dolgin, E. (2021). The tangled history of mRNA vaccines. *Nature*, *597*(7876), 318–324.
<https://doi.org/10.1038/d41586-021-02483-w>
- Downey, N. (2003). Extraction of DNA from Agarose Gels. En N. Casali & A. Preston (Eds.), *E. coli Plasmid Vectors: Methods and Applications* (pp. 137–139). Humana Press.
- Edwards, K. M., & Decker, M. D. (2018). 44 - Pertussis Vaccines. En S. A. Plotkin, W. A. Orenstein, P. A. Offit, & K. M. Edwards (Eds.), *Plotkin's Vaccines (Seventh Edition)* (pp. 711-761.e16). Elsevier.
- Ejeskär, K., Fransson, S., Zaibak, F., & Ioannou, P. A. (2006). Method for efficient transfection of in vitro-transcribed mRNA into SK-N-AS and HEK293 cells: difference in the toxicity of nuclear EGFP compared to cytoplasmic EGFP. *International Journal of Molecular Medicine*, *17*(6), 1011–1016.
- Entrican, G., & Francis, M. J. (2022). Applications of platform technologies in veterinary vaccinology and the benefits for one health. *Vaccine*, *40*(20), 2833–2840.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.03.059>

- Fang, E., Liu, X., Li, M., Zhang, Z., Song, L., Zhu, B., Wu, X., Liu, J., Zhao, D., & Li, Y. (2022). Advances in COVID-19 mRNA vaccine development. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7, 94. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00950-y>
- Fomsgaard, A., & Liu, M. A. (2021). The Key Role of Nucleic Acid Vaccines for One Health. *Viruses*, 13(2), 258. <https://doi.org/10.3390/v13020258>
- Frey, A. W., Ramos da Silva, J., Rosado, V. C., Bliss, C. M., Pine, M., Mui, B. L., Tam, Y. K., Madden, T. D., de Souza Ferreira, L. C., Weissman, D., Krammer, F., Coughlan, L., Palese, P., Pardi, N., & Nachbagauer, R. (2020). A Multi-Targeting, Nucleoside-Modified mRNA Influenza Virus Vaccine Provides Broad Protection in Mice. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 28(7), 1569–1584. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.04.018>
- Garver, K. A., LaPatra, S. E., & Kurath, G. (2005). Efficacy of an infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus DNA vaccine in Chinook *Oncorhynchus tshawytscha* and sockeye *O. nerka* salmon. *Diseases of Aquatic Organisms*, 64(1), 13–22. <https://doi.org/10.3354/dao064013>
- Gibco. (2015). *Cell Culture Basics Handbook* (Thermo Fis).
- Gire, S. K., Goba, A., Andersen, K. G., Sealfon, R. S. G., Park, D. J., Kanneh, L., Jalloh, S., Momoh, M., Fullah, M., Dudas, G., Wohl, S., Moses, L. M., Yozwiak, N. L., Winnicki, S., Matranga, C. B., Malboeuf, C. M., Qu, J., Gladden, A. D., Schaffner, S. F., ... Sabeti, P. C. (2014). Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science*, 345(6202), 1369–1372. <https://doi.org/10.1126/science.1259657>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). How to Win the Battle with RNase. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(2), pdb.top101857. <https://doi.org/10.1101/pdb.top101857>

- Greenwood, B. (2014). The contribution of vaccination to global health: past, present and future. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1645), 20130433. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0433>
- Gurdon, J. B., Lane, C. D., Woodland, H. R., & Marbaix, G. (1971). Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature*, 233(5316), 177–182. <https://doi.org/10.1038/233177a0>
- Heptinstall, J., & Rapley, R. (2000). Spectrophotometric Analysis of Nucleic Acids. En R. Rapley (Ed.), *The Nucleic Acid Protocols Handbook* (pp. 57–60). Humana Press.
- Holtkamp, S., Kreiter, S., Selmi, A., Simon, P., Koslowski, M., Huber, C., Türeci, O., & Sahin, U. (2006). Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood*, 108(13), 4009–4017. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-015024>
- Hou, X., Zaks, T., Langer, R., & Dong, Y. (2021). Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nature Reviews Materials*, 6(12), 1078–1094. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0>
- Huang, D., Zhao, D., Wang, X., Li, C., Yang, T., Du, L., Wei, Z., Cheng, Q., Cao, H., Liang, Z., Huang, Y., & Li, Z. (2018). Efficient delivery of nucleic acid molecules into skin by combined use of microneedle roller and flexible interdigitated electroporation array. *Theranostics*, 8(9), 2361. <https://doi.org/10.7150/thno.23438>
- Huang, X., Kong, N., Zhang, X., Cao, Y., Langer, R., & Tao, W. (2022). The landscape of mRNA nanomedicine. *Nature Medicine*, 28(11), 2273–2287. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-02061-1>
- Hui, D. S. C., & Chan, P. K. S. (2010). Severe Acute Respiratory Syndrome and Coronavirus. *Infectious Disease Clinics*, 24(3), 619–638. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2010.04.009>

- Humphreys, I. R., & Sebastian, S. (2018). Novel viral vectors in infectious diseases. *Immunology*, 153(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/imm.12829>
- Invitrogen. (2013). *Lipofectamine 2000 Reagent*.
- Jarzebska, N. T., Frei, J., Lauchli, S., French, L. E., Guenova, E., Gouttefangeas, C., Kündig, T. M., Mellett, M., & Pascolo, S. (2021). Lipofection with Synthetic mRNA as a Simple Method for T-Cell Immunomonitoring. *Viruses*, 13(7), 1232. <https://doi.org/10.3390/v13071232>
- Ji, H. (2010). Lysis of cultured cells for immunoprecipitation. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(8), pdb.prot5466. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5466>
- Jia, L., Mao, Y., Ji, Q., Dersh, D., Yewdell, J. W., & Qian, S.-B. (2020). Decoding mRNA translatability and stability from the 5' UTR. *Nature Structural & Molecular Biology*, 27(9), 814–821. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0465-x>
- Jorge, S., & Dellagostin, O. A. (2017). The development of veterinary vaccines: a review of traditional methods and modern biotechnology approaches. *Biotechnology Research and Innovation*, 1(1), 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.10.001>
- Karam, M., & Daoud, G. (2022). mRNA vaccines: Past, present, future. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(4), 491–522. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2022.05.003>
- Karikó, K., Buckstein, M., Ni, H., & Weissman, D. (2005). Suppression of RNA Recognition by Toll-like Receptors: The Impact of Nucleoside Modification and the Evolutionary Origin of RNA. *Immunity*, 23(2), 165–175. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.06.008>
- Karikó, K., Ni, H., Capodici, J., Lamphier, M., & Weissman, D. (2004). mRNA Is an Endogenous Ligand for Toll-like Receptor 3 *. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13), 12542–12550. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310175200>

- Krieg, P. A., & Melton, D. A. (1984). Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs. *Nucleic Acids Research*, *12*(18), 7057–7070.
<https://doi.org/10.1093/nar/12.18.7057>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage {T4}. *Nature*, *227*(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Le, T., Sun, C., Chang, J., Zhang, G., & Yin, X. (2022). mRNA Vaccine Development for Emerging Animal and Zoonotic Diseases. *Viruses*, *14*(2), 401. <https://doi.org/10.3390/v14020401>
- Leal, L., Guardo, A. C., Morón-López, S., Salgado, M., Mothe, B., Heirman, C., Pannus, P., Vanham, G., van den Ham, H. J., Gruters, R., Andeweg, A., Van Meirvenne, S., Pich, J., Arnaiz, J. A., Gatell, J. M., Brander, C., Thielemans, K., Martínez-Picado, J., Plana, M., & García, F. (2018). Phase I clinical trial of an intranodally administered mRNA-based therapeutic vaccine against HIV-1 infection. *AIDS (London, England)*, *32*(17), 2533–2545.
<https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000002026>
- Li, M., Zhao, M., Fu, Y., Li, Y., Gong, T., Zhang, Z., & Sun, X. (2016). Enhanced intranasal delivery of mRNA vaccine by overcoming the nasal epithelial barrier via intra- and paracellular pathways. *Journal of Controlled Release*, *228*, 9–19.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.02.043>
- Liang, Y., Huang, L., & Liu, T. (2021). Development and Delivery Systems of mRNA Vaccines. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *9*, 718753.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.718753>
- Liu, J., Budyłowski, P., Samson, R., Griffin, B. D., Babuadze, G., Rathod, B., Colwill, K., Abioye, J. A., Schwartz, J. A., Law, R., Yip, L., Ahn, S. K., Chau, S., Naghibosadat, M., Arita, Y., Hu, Q., Yue, F. Y., Banerjee, A., Hardy, W. R., ... Ostrowski, M. A. (2022). Preclinical

evaluation of a SARS-CoV-2 mRNA vaccine PTX-COVID19-B. *Science Advances*, 8(3), eabj9815. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abj9815>

Liu, M. A. (2019). A Comparison of Plasmid DNA and mRNA as Vaccine Technologies. *Vaccines*, 7(2), 37. <https://doi.org/10.3390/vaccines7020037>

Liu, Y., Liu, J., Du, S., Shan, C., Nie, K., Zhang, R., Li, X.-F., Zhang, R., Wang, T., Qin, C.-F., Wang, P., Shi, P.-Y., & Cheng, G. (2017). Evolutionary enhancement of Zika virus infectivity in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Nature*, 545(7655), 482–486. <https://doi.org/10.1038/nature22365>

Malone, R. W., Felgner, P. L., & Verma, I. M. (1989). Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(16), 6077–6081. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6077>

Martinon, F., Krishnan, S., Lenzen, G., Magné, R., Gomard, E., Guillet, J. G., Lévy, J. P., & Meulien, P. (1993). Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. *European Journal of Immunology*, 23(7), 1719–1722. <https://doi.org/10.1002/eji.1830230749>

McElwain, T. F., & Thumbi, S. M. (2017). Animal pathogens and their impact on animal health, the economy, food security, food safety and public health. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 36(2), 423. <https://doi.org/10.20506/rst.36.2.2663>

Melo, A. R. da S., de Macêdo, L. S., Invenção, M. da C. V., de Moura, I. A., da Gama, M. A. T. M., de Melo, C. M. L., Silva, A. J. D., Batista, M. V. de A., & Freitas, A. C. de. (2022). Third-Generation Vaccines: Features of Nucleic Acid Vaccines and Strategies to Improve Their Efficiency. *Genes*, 13(12), 2287. <https://doi.org/10.3390/genes13122287>

- Melton, D. A., Krieg, P. A., Rebagliati, M. R., Maniatis, T., Zinn, K., & Green, M. R. (1984). Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Research*, *12*(18), 7035–7056. <https://doi.org/10.1093/nar/12.18.7035>
- Mitra, S., & Tomar, P. C. (2021). Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects. *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology*, *19*, 159. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00264-6>
- Mockey, M., Gonçalves, C., Dupuy, F. P., Lemoine, F. M., Pichon, C., & Midoux, P. (2006). mRNA transfection of dendritic cells: synergistic effect of ARCA mRNA capping with Poly(A) chains in cis and in trans for a high protein expression level. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *340*(4), 1062–1068. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.105>
- Moradian, H., Lendlein, A., & Gossen, M. (2020). Strategies for simultaneous and successive delivery of RNA. *Journal of Molecular Medicine*, *98*(12), 1767–1779. <https://doi.org/10.1007/s00109-020-01956-1>
- Moreno Sandoval, H., Rangel Guerrero, S., Thompson Bonilla, R., Merino García, J., Lara Lozano, M., Piña Levya, C., Rosas Sandoval, G., Morán Mendoza, E., Rodríguez Gallegos, J., Calderón Rosete, G., Aguilar Setién, J., & González Barrios, J. (2014). Síndrome pulmonar por hantavirus, una amenaza latente en México. *Rev Esp Med Quir*, *19*, 96–103.
- Neumann, G., Noda, T., & Kawaoka, Y. (2009). Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*, *459*(7249), 931–939. <https://doi.org/10.1038/nature08157>
- New England Biolabs. (2018). *Restriction Digest Protocol*. New England BioLabs. <https://international.neb.com/protocols/2018/07/30/restriction-digest-protocol>

New England Biolabs. (2022a). *Avoiding RNase Contamination*. New England BioLabs.

<https://international.neb.com/tools-and-resources/video-library/avoiding-rnase-contamination?autoplay=1>

New England Biolabs. (2022b). *HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit*.

<https://international.neb.com/-/media/nebus/files/manuals/manuale2040.pdf?rev=1e110fde58434d5e8391bfb4437aa9be&hash=8ADE5261D2D918E7562A931B4B9A2C07>

New England Biolabs. (2022c). *Vaccinia Capping System*.

<https://international.neb.com/products/m2080-vaccinia-capping-system#Product%20Information>

Oluwagbemi, O. O., Oladipo, E. K., Kolawole, O. M., Oloke, J. K., Adelusi, T. I., Irewolede, B. A., Dairo, E. O., Ayeni, A. E., Kolapo, K. T., Akindiya, O. E., Oluwasegun, J. A., Oluwadara, B. F., & Fatumo, S. (2022). Bioinformatics, Computational Informatics, and Modeling Approaches to the Design of mRNA COVID-19 Vaccine Candidates. *Computation*, 10(7), 117. <https://doi.org/10.3390/computation10070117>

Omega Bio-Tek. (2017). *E.Z.N.A.®Cycle Pure Kit Product Manual*.

https://www.omegabiotek.com/wp-content/uploads/2018/07/D6492_D6493-PROTOCOL-E.Z.N.A.-Cycle-Pure-Kit-Combo.pdf

Ostro, M. J., Giacomoni, D., Lavelle, D., Paxton, W., & Dray, S. (1978). Evidence for translation of rabbit globin mRNA after liposomemediated insertion into a human cell line. *Nature*, 274(5674), 921–923. <https://doi.org/10.1038/274921a0>

Pan, C., Yue, H., Zhu, L., Ma, G., & Wang, H. (2021). Prophylactic vaccine delivery systems against epidemic infectious diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 176, 113867.

<https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113867>

- Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W., & Weissman, D. (2018). mRNA vaccines — a new era in vaccinology. *Nature Reviews Drug Discovery*, *17*(4), 261–279.
<https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>
- Peng, J., & Schoenberg, D. (2005). mRNA with a <20-nt poly(A) tail imparted by the poly(A)-limiting element is translated as efficiently in vivo as long poly(A) mRNA. *RNA*, *11*(7), 1131–1140. <https://doi.org/10.1261/rna.2470905>
- Pilkington, E. H., Suys, E. J. A., Trevaskis, N. L., Wheatley, A. K., Zukancic, D., Algarni, A., Al-Wassiti, H., Davis, T. P., Pouton, C. W., Kent, S. J., & Truong, N. P. (2021). From influenza to COVID-19: Lipid nanoparticle mRNA vaccines at the frontiers of infectious diseases. *Acta Biomaterialia*, *131*, 16–40. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.06.023>
- Polack, F. P., Thomas, S. J., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., Perez, J. L., Pérez Marc, G., Moreira, E. D., Zerbini, C., Bailey, R., Swanson, K. A., Roychoudhury, S., Koury, K., Li, P., Kalina, W. V, Cooper, D., Frenck, R. W., Hammitt, L. L., ... Gruber, W. C. (2020). Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *New England Journal of Medicine*, *383*(27), 2603–2615. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577>
- Rahman, Md. T., Sobur, Md. A., Islam, Md. S., Levy, S., Hossain, Md. J., El Zowalaty, M. E., Rahman, A. M. M. T., & Ashour, H. M. (2020). Zoonotic Diseases: Etiology, Impact, and Control. *Microorganisms*, *8*(9), 1405. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091405>
- Rosa, S. S., Prazeres, D. M. F., Azevedo, A. M., & Marques, M. P. C. (2021). mRNA vaccines manufacturing: Challenges and bottlenecks. *Vaccine*, *39*(16), 2190–2200.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.03.038>
- Roth, C., Cantaert, T., Colas, C., Prot, M., Casadémont, I., Levillayer, L., Thalmensi, J., Langlade-Demoyen, P., Gerke, C., Bahl, K., Ciaramella, G., Simon-Loriere, E., & Sakuntabhai, A. (2019). A Modified mRNA Vaccine Targeting Immunodominant NS Epitopes Protects

Against Dengue Virus Infection in HLA Class I Transgenic Mice. *Frontiers in Immunology*, 10.

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(4), pdb.prot4540. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4540>

Schlake, T., Thess, A., Fotin-Mleczek, M., & Kallen, K.-J. (2012). Developing mRNA-vaccine technologies. *RNA Biology*, 9(11), 1319–1330. <https://doi.org/10.4161/rna.22269>

Stanton, M. G., & Murphy-Benenato, K. E. (2018). Messenger RNA as a novel therapeutic approach. En *RNA Therapeutics* (pp. 237–253). Springer International Publishing.

Stewart-Jones, G. (2021). *Sars-cov-2 mrna domain vaccines*. Modernatx, Inc.

Stewart-Jones, G., Narayanan, E., Bennett, H., Carfi, A., Metkar, M., & Presnyak, V. (2021). *Coronavirus rna vaccines*. Modernatx, Inc.

Stitz, L., Vogel, A., Schnee, M., Voss, D., Rauch, S., Mutzke, T., Ketterer, T., Kramps, T., & Petsch, B. (2017). A thermostable messenger RNA based vaccine against rabies. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(12), e0006108. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006108>

Sun, W., He, L., Zhang, H., Tian, X., Bai, Z., Sun, L., Yang, L., Jia, X., Bi, Y., Luo, T., Cheng, G., Fan, W., Liu, W., & Li, J. (2021). The self-assembled nanoparticle-based trimeric RBD mRNA vaccine elicits robust and durable protective immunity against SARS-CoV-2 in mice. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6, 340. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00750-w>

Sun, X., Zeng, L., & Huang, Y. (2019). Transcutaneous delivery of DNA/mRNA for cancer therapeutic vaccination. *The Journal of Gene Medicine*, 21(7), e3089. <https://doi.org/10.1002/jgm.3089>

- Tan, L., Zheng, T., Li, M., Zhong, X., Tang, Y., Qin, M., & Sun, X. (2020). Optimization of an mRNA vaccine assisted with cyclodextrin-polyethyleneimine conjugates. *Drug Delivery and Translational Research*, 10(3), 678–689. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00725-4>
- Thermo Scientific. (2015). *GeneJET PCR Purification Kit*. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012661_GeneJET_Gel_Extraction_UG.pdf
- Tüzmen, S., Baskin, Y., Nursal, A. F., Eraslan, S., Esemeyen, Y., Çalibas, G., Demir, A. B., Abbasoglu, D., & Hizel, C. (2018). Techniques for Nucleic Acid Engineering: The Foundation of Gene Manipulation. *Omics Technologies and Bio-engineering: Towards Improving Quality of Life*, 1, 247–315. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804659-3.00014-2>
- van Seventer, J. M., & Hochberg, N. S. (2017). Principles of Infectious Diseases: Transmission, Diagnosis, Prevention, and Control. En S. R. Quah (Ed.), *International Encyclopedia of Public Health (Second Edition)* (pp. 22–39). Academic Press.
- Verbeke, R., Lentacker, I., De Smedt, S. C., & Dewitte, H. (2019). Three decades of messenger RNA vaccine development. *Nano Today*, 28, 100766. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2019.100766>
- Wang, Y., Zhang, L., Xu, Z., Miao, L., & Huang, L. (2018). mRNA Vaccine with Antigen-Specific Checkpoint Blockade Induces an Enhanced Immune Response against Established Melanoma. *Molecular Therapy*, 26(2), 420–434. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.11.009>
- Whitaker, J. A., Valles, K., Tosh, P. K., & Poland, G. A. (2019). Chapter 9 - Vaccine Use in Immunocompromised Adults: Challenges and Solutions. En G. A. Poland (Ed.), *Vaccinations* (pp. 139–162). Elsevier.

- Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., & Felgner, P. L. (1990). Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in Vivo. *Science*, *247*(4949), 1465–1468. <https://doi.org/10.1126/science.1690918>
- Xiong, Q., Lee, G. Y., Ding, J., Li, W., & Shi, J. (2018). Biomedical applications of mRNA nanomedicine. *Nano Research*, *11*(10), 5281–5309. <https://doi.org/10.1007/s12274-018-2146-1>
- Xu, S., Yang, K., Li, R., & Zhang, L. (2020). mRNA Vaccine Era—Mechanisms, Drug Platform and Clinical Prospection. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(18), 6582. <https://doi.org/10.3390/ijms21186582>
- Yen, L. M., & Thwaites, C. L. (2019). Tetanus. *The Lancet*, *393*(10181), 1657–1668. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)33131-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)33131-3)
- Yilmaz, M., Ozic, C., Gok, İ., Yilmaz, M., Ozic, C., & Gok, İ. (2012). *Principles of Nucleic Acid Separation by Agarose Gel Electrophoresis*. IntechOpen.
- Zhang, C., Maruggi, G., Shan, H., & Li, J. (2019). Advances in mRNA Vaccines for Infectious Diseases. *Frontiers in Immunology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00594>
- Zhang, N.-N., Li, X.-F., Deng, Y.-Q., Zhao, H., Huang, Y.-J., Yang, G., Huang, W.-J., Gao, P., Zhou, C., Zhang, R.-R., Guo, Y., Sun, S.-H., Fan, H., Zu, S.-L., Chen, Q., He, Q., Cao, T.-S., Huang, X.-Y., Qiu, H.-Y., ... Qin, C.-F. (2020). A Thermostable mRNA Vaccine against COVID-19. *Cell*, *182*(5), 1271-1283.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.024>
- Zhao, M., Li, M., Zhang, Z., Gong, T., & Sun, X. (2016). Induction of HIV-1 gag specific immune responses by cationic micelles mediated delivery of gag mRNA. *Drug Delivery*, *23*(7), 2596–2607. <https://doi.org/10.3109/10717544.2015.1038856>

Zhou, P., Yang, X.-L., Wang, X.-G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.-R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.-L., Chen, H.-D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R.-D., Liu, M.-Q., Chen, Y., Shen, X.-R., Wang, X., ... Shi, Z.-L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, *579*(7798), 270–273.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>

Apéndices