

2025
Análisis molecular de un baculovirus recombinante que expresa la
proteína S de SARS-CoV-2

Israel Crisanto
Mendoza



Universidad de Guanajuato
Campus Irapuato-Salamanca
División de Ciencias de la Vida

Análisis molecular de
un baculovirus
recombinante que
expresa la proteína S
de SARS-CoV-2

Tesis
Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Biociencias

Presenta

Israel de Jesús Crisanto Mendoza

Director de Tesis: Dra. María Cristina del Rincón Castro

Irapuato, Gto., 25 de julio de 2025



Universidad de Guanajuato
División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca
Maestría

NOMBRE DE LA TESIS

Análisis molecular de un baculovirus recombinante que expresa la proteína S de SARS-CoV-2

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Maestro en Biociencias

Presenta:

Israel de Jesús Crisanto Mendoza

Dirigido por:

Ma. Cristina del Rincón Castro

SINODALES

Ma. Fabiola León Galván
Presidente

Firma

Jorge Eric Ruiz Nieto
Secretario

Firma

María Cristina del Rincón Castro
Vocal

Firma

Universidad de Guanajuato
Irapuato, Gto., México, 25 de julio
de 2025.



CAMPUS Irapuato - Salamanca

Universidad
de Guanajuato

"Universidad de Guanajuato: 80 años de ser la Universidad Pública del Estado".
"2025, a 200 años de la instalación del Primer Congreso Constituyente de Guanajuato"
"30 años de autonomía universitaria, un legado de responsabilidad y libertad"

DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

"Análisis molecular de un baculovirus recombinante que expresa la proteína S de SARS-CoV-2"

TESIS

QUE PRESENTA

ISRAEL DE JESUS CRISANTO MENDOZA

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOCIENCIAS

DIRECTOR DE TESIS

DRA. MARÍA CRISTINA DEL RINCÓN CASTRO

Irapuato, Gto., Agosto de 2025.



**Universidad
de Guanajuato**

CAMPUS IRAPUATO - SALAMANCA

"Universidad de Guanajuato: 80 años de ser la Universidad Pública del Estado".
"2025, a 200 años de la instalación del Primer Congreso Constituyente de Guanajuato"
"30 años de autonomía universitaria, un legado de responsabilidad y libertad"

DIRECCIÓN

Oficio: DICIVA/0333/2025.

Asunto: TEMA DE TRABAJO.

C.

DR. JUAN ANTONIO RAMÍREZ VÁZQUEZ,
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA
CAMPUS IRAPUATO – SALAMANCA,
P R E S E N T E.

En relación al trabajo de titulación del C. ISRAEL DE JESÚS
CRISANTO MENDOZA, me permito comunicar a Usted que el tema
señalado fue:

**"Análisis molecular de un baculovirus
recombinante que expresa la proteína S de SARS-
CoV-2"**

Y que dicho trabajo ha sido totalmente elaborado y cuenta con mi
aprobación.

Asimismo, me permito proponer a:

**DRA. MA. FABIOLA LEÓN GALVÁN
DR. JORGE ERIC RUIZ NIETO**

Para que junto conmigo integren el Jurado.

A T E N T A M E N T E
"LA VERDAD OS HARA LIBRES"
Irapuato, Gto., 7 de Junio de 2025
DIRECTOR DE TESIS

DRA. MARÍA CRISTINA DEL RINCÓN CASTRO



Universidad
de Guanajuato

CAMPUS Irapuato - SALAMANCA

"Universidad de Guanajuato: 80 años de ser la Universidad Pública del Estado".
"2025, a 200 años de la instalación del Primer Congreso Constituyente de Guanajuato"
"30 años de autonomía universitaria, un legado de responsabilidad y libertad"

DIRECCIÓN

Oficio: DICIVA/0334/2025.

Asunto: REVISIÓN DE TESIS.

Irapuato, Gto., 10 de Junio de 2025.

C.

DR. JUAN ANTONIO RAMÍREZ VÁZQUEZ
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA
CAMPUS Irapuato – SALAMANCA,
P R E S E N T E.

Habiendo revisado la Tesis del Pasante C. **ISRAEL DE JESÚS CRISANTO MENDOZA,**

Titulada:

"Análisis molecular de un baculovirus recombinante que expresa la proteína S de SARS-CoV-2"

Damos nuestra aprobación para la impresión de la misma.

DIRECTOR

DRA. MARÍA CRISTINA DEL RINCÓN CASTRO

SINODAL

DRA. MA. FABIOLA LEÓN GALVÁN

SINODAL

DR. JORGE ERIC RUIZ NIETO



**Universidad
de Guanajuato**

CAMPUS IRAPUATO - SALAMANCA

"Universidad de Guanajuato: 80 años de ser la Universidad Pública del Estado".
"2025, a 200 años de la instalación del Primer Congreso Constituyente de Guanajuato"
"30 años de autonomía universitaria, un legado de responsabilidad y libertad"

DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

C.

DR. JUAN ANTONIO RAMÍREZ VÁZQUEZ,
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA
CAMPUS IRAPUATO - SALAMANCA,
P R E S E N T E .

En relación al trabajo de titulación del C. ISRAEL DE JESÚS CRISANTO MENDOZA, nos permitimos comunicar a Usted que el trabajo de Tesis: "Análisis molecular de un baculovirus recombinante que expresa la proteína S de SARS-CoV-2", que fue desarrollado bajo la dirección de la Dra. María Cristina Del Rincón Castro Profesora de la División de Ciencias de la Vida, ha sido terminado. El escrito fue revisado por la Dra. Ma. Fabiola León Galván y el Dr. Jorge Eric Ruiz Nieto y se autorizó la impresión y empastado del mismo.

Así mismo, nos permitimos proponer para la integración del Jurado a los Señores;

DRA. MA. FABIOLA LEÓN GALVÁN	PRESIDENTE
DR. JORGE ERIC RUIZ NIETO	SECRETARIO
DRA. MARÍA CRISTINA DEL RINCÓN CASTRO	SINODAL

A T E N T A M E N T E
"LA VERDAD OS HARA LIBRES"
Irapuato, Gto., 13 de Junio de 2025.
DIRECTOR

DRA. MARÍA CRISTINA DEL RINCÓN CASTRO

REVISOR

DRA. MA. FABIOLA LEÓN GALVÁN

REVISOR

DR. JORGE ERIC RUIZ NIETO



"Universidad de Guanajuato: 80 años de ser la Universidad Pública del Estado".
"2025, a 200 años de la instalación del Primer Congreso Constituyente de Guanajuato"
"30 años de autonomía universitaria, un legado de responsabilidad y libertad"

DIRECCION.

Oficio: DICIVA/0360/2025.

Asunto: **Autorización de Titulación.**

C.

ISRAEL DE JESÚS CRISANTO MENDOZA,
MAESTRIA EN BIOCIENCIAS
P R E S E N T E.

Por medio de la presente y una vez revisado que ha cumplido íntegramente el plan de estudios del Programa Académico y, con base en el Artículo 79 del Reglamento Académico de la Normatividad de la Universidad de Guanajuato Vigente, me permito indicarle que doy mi autorización para que se titule por **Trabajo de Tesis**.

Sin otro asunto y enviándole un cordial saludo, se despide.

A T E N T A M E N T E
"LA VERDAD OS HARA LIBRES"
Irapuato, Gto. 12 de Junio de 2025.
EL DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA
CAMPUS IRAPUATO-SALAMANCA



DR. JUAN ANTONIO RAMÍREZ VÁZQUEZ.

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
CAMPUS IRAPUATO-SALAMANCA
División de Ciencias de la Vida
Ex-Hacienda El Copal Irapuato, Gto.
- DIRECCIÓN -

C.c.p. Archivo .
JARV/mcla.

División de Ciencias de la Vida

Ex Hacienda El Copal, Km. 9 Carretera Irapuato-Silao;
C.P. 36824 A.P. 311, Irapuato, Gto., México

Teléfono: 01(462) 6241889

LA PRESENTE TESIS SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA Y VEGETAL, EN LA DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA, CAMPUS IRAPUATO-SALAMANCA DE LA UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO; CON APOYO ECONÓMICO DE SECIHTI AL ORTORGAR LA BECA NO. 1326661 Y BAJO LA DIRECCION DE LA DRA. MARÍA CRISTINA DEL RINCÓN CASTRO.

RESUMEN

Los baculovirus son excelentes vectores de expresión de genes eucarióticos y hasta la fecha, miles de baculovirus recombinantes se han producido en el sistema de expresión Bac to Bac. El objetivo de este trabajo fue la sobreexpresión del gen de la proteína S del SAR-CoV-2, en el sistema Bac to Bac de baculovirus para producir grandes cantidades de esta proteína y poder utilizarla para la producción de anticuerpos en sistemas alternos, para la producción y escalamiento en el futuro, de una vacuna contra el SARS-CoV-2.

Se partió de un baculovirus recombinante generado con el sistema Bac to Bac, denominado *BackSpike*. Se realizó la infección de larvas de *Spodoptera frugiperda* con los viriones recombinantes y se identificaron larvas que presentaron signos de infección a las 72 h.p.i, entre los cuales se incluyen: hemocitos con núcleos hipertrofiados y membranas disgregadas, sin presencia de cuerpos de oclusión. Se extrajo ADN de hemocitos y larvas completas donde se confirmó la presencia del gen de la proteína Spike, de 1000 pb, y la dirección del inserto, de 1200 pb, utilizando diseñados específicamente para esos dos fines.

Para identificar a las dos subunidades de la proteína S del SARS-CoV-2 se realizaron geles de poliacrilamida al 12%. Se extrajo proteína total de larvas infectadas y de larvas sin infectar como control negativo, y se observaron 2 bandas de 65-70 kDa en las muestras de larvas infectadas que corresponden a las dos bandas en las cuales se escinde la proteína S durante el proceso de infección.

Con el fin de analizar el potencial inmunogénico de la proteína S generada con el sistema Bac to Bac, se realizó una prueba rápida en un ejemplar de ratón hembra de la cepa BALB/c, llevando a cabo tres inoculaciones de la proteína S con adyuvante de Freund.

En las pruebas de las características nociceptivas, el peso del ratón mostró una tendencia al alza hasta el día 14 post inmunización, seguido de una ligera disminución. La temperatura corporal se mantuvo estable con una ligera hipotermia después de la tercera inmunización. Por su parte, la reacción a estímulos mecánicos disminuyó solo después de la tercera inoculación, y la respuesta del reflejo pupilar a la luz disminuyó después de la segunda inmunización. Los ensayos de ELISA mostraron producción de anticuerpos anti-IgG contra la proteína S de SARS-CoV-2.

El sistema Bac to Bac de baculovirus presentó deficiencias para la expresión de la proteína S del SARS-CoV-2, ésta se pudo expresar en bajas cantidades, sin embargo, desarrolló respuesta inmunogénica en el ratón infectado. Es necesario realizar más pruebas inmunológicas para analizar su efectividad.

Abstract

Baculoviruses are excellent vectors for the expression of eukaryotic genes, and to date, thousands of recombinant baculoviruses have been produced using this expression system Bac to Bac. The objective of this study was the overexpression of the SARS-CoV-2 spike (S) protein gene using the Bac-to-Bac baculovirus system, with the aim of producing large quantities of this protein for the generation of antibodies in alternative systems, and to support future production and scale-up of a vaccine against SARS-CoV-2.

The study began with a recombinant baculovirus generated using the Bac-to-Bac system, designated *BackSpike*. Larvae of *Spodoptera frugiperda* were infected with the recombinant virions, and signs of infection were observed at 72 hours post-infection (h.p.i.), including hemocytes with hypertrophied nuclei and disrupted membranes, in the absence of occlusion bodies. DNA was extracted from hemocytes and whole larvae, confirming the presence of the spike gene (1000 bp) and the correct orientation of the insert (1200 bp), using specifically designed oligonucleotides.

To identify the two subunits of the SARS-CoV-2 S protein, 12% polyacrylamide gels were used. Total protein was extracted from infected and uninfected larvae, used as negative control. Two bands of approximately 65–70 kDa were observed in the infected larvae samples, corresponding to the cleavage products of the S protein during infection.

To evaluate the immunogenic potential of the S protein produced via the Bac-to-Bac system, a rapid immunization trial was conducted in a female BALB/c mouse, which received three inoculations of the S protein formulated with Freund's adjuvant.

In nociceptive assessments, the mouse's body weight showed an upward trend until day 14 post-immunization, followed by a slight decrease. Body temperature remained stable with minor fluctuations. Mechanical stimulus response decreased only after the third inoculation, and the pupillary light reflex diminished after the second immunization. ELISA assays confirmed the production of S protein anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies.

Although the Bac-to-Bac baculovirus system exhibited limitations in expressing the SARS-CoV-2 S protein—yielding only low quantities—it successfully elicited an immunogenic response in the immunized mouse. Further immunological studies are necessary to evaluate its effectiveness.

DEDICATORIA

Para Verónica, por los tiempos que siempre nos van a pertenecer:

“Pero en el fondo de tus ojos no hay alegría, sino pura tristeza; como si tus ojos supieran que no existe la dicha y que todo lo bello y amado es efímero. Tienes los más hermosos ojos que puede haber, y también los más tristes.”

J.R.R Tolkien en *El Señor de los Anillos: El Retorno del Rey*.

AGRADECIMIENTOS

Antes que a nadie quiero agradecer al Rey Mesías, Yeshua, y a su madre, Miriam, por permitirme haber concluido mis estudios de maestría.

A la Dra. Ma. Cristina del Rincón Castro, con cariño, admiración y respeto; por toda la paciencia que tuvo conmigo, tanto académicamente como personalmente.

Al Dr. Jonatan Rangel Núñez, quien, con mucha paciencia, me enseño las técnicas necesarias para la consecución de este proyecto. Con cariño, admiración y respeto.

A mis compañeras de laboratorio: Vero, Ale, Poli y Angie, por haberme apoyado en el día a día en el laboratorio.

A mis sinodales, Dres. Fabiola León Galván y Erick Ruiz Nieto, por todas sus correcciones y apoyo en la interpretación de los resultados.

A la SECIHTI por el apoyo económico para cursar el posgrado.

A la Dra. Elizabeth Reyes Martínez, de la División de Ciencias Naturales y Exactas, antes Instituto de Investigación en Biología Experimental, por todo el apoyo técnico en el manejo murino y la guía en temas de inmunología. Con mucho cariño.

A la Dra. Rosario Ramírez Zúñiga, por el apoyo técnico en las pruebas inmunológicas.

A mis padres, María y Sergio, por su apoyo incondicional; a mi tía Hermelinda, que muchas veces saco a flote este barco y que es una madre para mí.

A Geraldine Arredondo, quien siempre me ayudo en los momentos de duda durante el desarrollo de este proyecto. Con cariño, admiración y respeto.

ÍNDICE

	Página
Resumen	I
Abstract	II
Dedicatorias	III
Agradecimientos	IV
Índice	V
Índice de tablas	VI
Índice de figuras	VII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
III. MARCO TEÓRICO	4
IV. ANTECEDENTES	11
V. JUSTIFICACIÓN	22
VI. HIPÓTESIS	23
VII. OBJETIVOS	23
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	24
IX. RESULTADOS	34
X. DISCUSIÓN	61
XI. CONCLUSIONES	75
XII. PERSPECTIVAS	77
XIII. BIBLIOGRAFÍA	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Oligonucleótidos específicos usados para la amplificación del gen de la proteína Spike.....	12
Tabla 2. Criterio del valor de la correlación r de Pearson para la determinación de correlación en las características nociceptivas del ejemplar murino de la cepa BALB/c.....	33
Tabla 3. Resultados de la medición del peso del ejemplar de ratón hembra de la cepa BALB/c en función de los días post inmunización con extracto de proteína extraído de larvas de <i>S. frugiperda</i> infectadas con <i>BackSpike</i>	46
Tabla 4. Resultados de la medición de la temperatura corporal del ejemplar de ratón hembra de la cepa BALB/c en función de los días post inmunización con con extracto de proteína extraído de larvas de <i>S. frugiperda</i> infectadas con <i>BackSpike</i>	49
Tabla 5. Resultados de la medición de la respuesta a estímulos mecánicos del ejemplar murino de la cepa BLAB/c en función de los días post inmunización con extracto de proteína extraído de larvas de <i>S. frugiperda</i> infectadas con <i>BackSpike</i>	52
Tabla 6. Resultados de la medición del reflejo pupilar del ejemplar murino BALB/c en función de los días post inmunización con extracto de proteína extraído de larvas de <i>S. frugiperda</i> infectadas con <i>BackSpike</i>	53
Tabla 7. Absorbancias del suero preinmune de ratón hembra de la cepa BALB/c y el suero inmune 2 del mismo ejemplar a 5, 10, 15 y 30 minutos de incubación.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. El genoma del SARS-CoV-2 de ARN de cadena sencilla con polaridad positiva (+ssARN).....	5
2. Estructura del virión de SARS-CoV-2 que ilustra las proteínas estructurales y no estructurales, además de la organización CAP y Poli-A del genoma.....	6
3. Estructura de la proteína S de SARS-CoV-2	8
4. Figura 4. Estructuras del dominio N-terminal NTD de la proteína S del SARS-CoV-2 y sus complejos con anticuerpos	8
5. Mecanismo de entrada del SARS-CoV-2 a la célula y su ciclo replicativo.....	10
6. Vector <i>pTwist EF1 Alpha nCoV-2019-S-2xStrep</i> con la secuencia de la proteína Spike de SARS-CoV-2...	12
7. Mapa de <i>pFastBac</i> , utilizado en la construcción de los baculovirus recombinantes <i>BackSpike</i>	13
8. Ciclo de infección primaria y secundaria por baculovirus en Lepidópteros	17
9. Larvas de <i>S. frugiperda</i> infectadas con el virus <i>BackSpike</i>	35
10.Hemocitos de larvas de <i>S. frugiperda</i> con y sin infección por el virus <i>BackSpike</i>	36
11.Hemocitos de <i>S. frugiperda</i> con signos de infección por baculovirus	36
12. Infección de la línea celular Sf9 con viriones <i>BackSpike</i>	37
13.ADN extraído de larva completa y de hemocitos de <i>S. frugiperda</i>	38
14.Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de muestras de ADN extraído de <i>S. frugiperda</i> infectados con <i>BackSpike</i>	39
15.Electroforesis en gel de agarosa 0.8% de la amplificación del fragmento del gen de la proteína S de SARS-CoV-2... ..	39

16. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% de la amplificación del fragmento del gen de la proteína S de <i>S. frugiperda</i> en hemocitos infectados con <i>BackSpike</i>	40
17. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% de la amplificación de la dirección del inserto del gen de la proteína S de SARS-CoV-2 en muestras de larvas y hemocitos de <i>S. frugiperda</i> infectados con <i>BackSpike</i>	40
18. Gel de acrilamida al 12% SDS-PAGE, de proteína total extraída de larvas de <i>S. frugiperda</i> con signos de infección por <i>BackSpike</i>	43
19. Gel de acrilamida al 12% SDS-PAGE de proteína total extraída de larvas de <i>S. frugiperda</i> con signos de infección por <i>BackSpike</i>	43
20. Obtención de suero preinmune de ratón hembra de la cepa BALB/c....	44
21.. Análisis del bazo del ejemplar murino de la cepa BALB/c Inoculado con extracto de proteína extraído de larvas de <i>S. frugiperda</i> infectadas con <i>BackSpike</i>	45
22. Análisis de las placas de Peyer del ejemplar murino de la cepa BALB/c inoculado con extracto de proteína extraído de larvas de <i>S. frugiperda</i> infectadas con <i>BackSpike</i>	45
23. Gráfica de correlación lineal del promedio del peso del ejemplar murino de cepa BALB/c en función de los días post inoculación con extracto de proteína extraído de larvas de <i>S. frugiperda</i> infectadas con <i>BackSpike</i>	47
24. Gráfica de líneas de la relación del promedio del peso del ejemplar murino de la cepa BALB/c en función de los días post inoculación con extracto de proteína extraído de larvas de <i>S. frugiperda</i> infectadas con <i>BackSpike</i>	48

25. Gráfica de correlación lineal del promedio de la temperatura corporal del ejemplar murino BALB/c en función de los días post inoculación con extracto de proteína extraído de larvas de <i>S. frugiperda</i> infectadas con <i>BackSpike</i>	50
26. Gráfica de líneas de la relación del promedio la temperatura corporal Del ejemplar murino BALB/c en función de los días post inoculación con extracto de proteína extraído de larvas de <i>S. frugiperda</i> infectadas con <i>BackSpike</i>	51
27. Gráfica de correlación lineal del promedio del tiempo de reflejo pupilar del ejemplar murino BALB/c en función de los días post inoculación con extracto de proteína extraído de larvas de <i>S. frugiperda</i> infectadas con <i>BackSpike</i>	54
28. Gráfica de líneas de la relación del promedio del tiempo de reflejo pupilar del ejemplar murino BALB/c en función de los días post inoculación con extracto de proteína extraído de larvas de <i>S. frugiperda</i> infectadas con <i>BackSpike</i>	55
29. Placa de ELISA a los 30 minutos de incubación con solución de revelado	57
30. Gráficas de la absorbancia del suero preinmune y el suero inmune a diferentes tiempos de incubación minutos de incubación.....	58
31. Gráfica comparativa de la absorbancia del suero preinmune y el suero inmune a diferentes tiempos de incubación resaltando la comparación con la dilución 1:900, como el título de anticuerpos.....	59
32. Gráfica de la absorbancia del suero inmune 2 obtenido del ratón hembra BALB/c en diferentes tiempos de incubación con solución de revelado.....	60

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biotecnología Alimentaria y Vegetal, de la División de Ciencias de la Vida, de la Universidad de Guanajuato. Se obtuvo un Baculovirus recombinante denominado **BackSpike**, generado por el Dr. Jonatan Carmen Rangel Núñez, utilizando el sistema Bac to Bac y eliminando el gen de la proteína poliedrina, una proteína estructural del baculovirus *AcMNPV*, y en su lugar se colocó el gen de la proteína S de SARS-CoV-2, el cual se obtuvo de un plásmido donador, *pTwist EF1 Alpha nCoV-2019-S-2xStrep*. Mediante el ligamiento al vector *pFastBac* se introdujo el gen de la proteína S en células de *Escherichia coli* DH10Bac por recombinación. Posteriormente, se realizó la co-transfección de una línea celular, Sf-9, de *Spodoptera frugiperda* con el ADN obtenido de las células de *E. coli DHBac*, por el método de cloruro de calcio, y se purificaron los viriones de las células que mostraran signos de infección por baculovirus (presencia del estroma virogénico, agrandamiento del núcleo y disgregación de la membrana celular) pero sin presencia de cuerpos de oclusión típicos en los baculovirus que tienen el gen de la poliedrina. Aprovechando estos viriones, se realizó la infección por inoculación directa con jeringa de larvas de *S. frugiperda* y se obtuvo el ADN total de las larvas y el ADN de la hemolinfa (al mismo tiempo que se verificó el seguimiento de los síntomas de infección por baculovirus, pero sin la presencia de cuerpos de oclusión). Con el ADN obtenido de larvas y hemolinfa, se realizaron PCR para corroborar la presencia del gen de la proteína S, y para verificar la dirección del inserto. Los amplicones, obtenidos son de 1,000 pb para la presencia del gen y de 1,200 pb para la dirección del inserto, según los esperado y reportado por Rangel Núñez, 2021. Una vez verificada tanto la presencia como la dirección del inserto, esto indicativo de que la proteína S de SARS-CoV-2 se expresó expresando en el sistema de larvas de *S. frugiperda*, con lo que se procedió a realizar la extracción total de proteínas de larvas infectadas con *BackSpike*. Se realizaron geles de poliacrilamida al 12% observándose dos bandas de alrededor de 65-70 KDa, que correspondían a las dos subunidades de la proteína S. Posteriormente, se realizaron centrifugaciones

diferenciales para separar la proteína S de las muestras de proteinas totales, así como calentamientos para precipitar las proteinas propias de la larva. Posteriormente, se procedió a realizar una prueba rápida con un ratón hembra de la cepa BALB/c. Los resultados de la evaluación de las características nociceptivas mostraron que el peso del ratón mostró una tendencia al alza hasta el día 14 post inmunización, seguido de una ligera disminución. La temperatura corporal se mantuvo estable con ligeras fluctuaciones y la tendencia a la hipotermia después de la tercera inmunización. Por su parte, la fracción a estímulos mecánicos disminuyó solo después de la tercera inmunización, y la respuesta del reflejo pupilar a la luz disminuyó después de la segunda inmunización. Los ensayos de ELISA mostraron producción de anticuerpos anti-IgG contra la proteína S SARS-CoV2 y se obtuvo que la dilución de suero inmune 1:900 fue el título de anticuerpos, que representa la mayor dilución del suero en la que aún se puede detectar una señal específica de unión del anticuerpo al antígeno por encima del umbral de detección generado con el suero pre inmune usado como blanco.

II.REVISIÓN DE LITERATURA

El sistema Bac to Bac es una plataforma de expresión de genes en baculovirus de *AcMNPV*, que utiliza células de insecto para la producción eficiente de proteínas recombinantes, incluyendo antígenos virales para el desarrollo de vacunas. Este sistema se caracteriza por su capacidad para insertar genes exógenos en una copia del genoma de *AcMNPV* llamado Bácmido, mediante recombinación homóloga en células *DH10Bac* de *E. coli*, lo que facilita la generación de baculovirus recombinantes que expresan la proteína de interés en líneas celulares de insecto o en larvas completas de insectos como *S. frugiperda* (Luckow et al., 1993; Kost et al., 2005). Debido a la alta expresión de proteínas en el sistema Bac to Bac, este se ha empleado exitosamente para producir vacunas recombinantes contra diversos virus, incluyendo el virus de la influenza H1N1 y el virus de papiloma humano (Felberbaum, 2015; Jarvis, 2009).

Sin embargo, a pesar del potencial del sistema para la producción de vacunas, su aplicación en la generación de una vacuna eficaz contra SARS-CoV-2 ha presentado múltiples retos. La complejidad estructural de la proteína Spike, su glicosilación y la necesidad de un correcto plegamiento para mantener su conformación nativa funcional dificultan su expresión adecuada en células de insecto, que poseen un sistema de glicosilación diferente al de mamíferos (Watanabe et al, 2020; Moretti & Llacovache, 2019). Además, la producción de partículas virales funcionales recombinantes estables y la replicación eficiente en insectos puede verse limitada por la delección de genes estructurales como el de la poliedrina (Kemp et al., 2004; van Oers et al., 2015). Estas dificultades, aunadas el hecho de que *E. coli* posee un tiempo de replicación muy rápido que puede ser insuficiente para replicar el gen completo de una proteína de mamífero, explican por qué hasta la fecha no se ha logrado desarrollar una vacuna basada exclusivamente en baculovirus recombinantes del sistema Bac to Bac que haya alcanzado éxito comercial.

Se han realizado diversos experimentos para producir una vacuna contra SARS-CoV-2 usando el sistema Bac to Bac, pero la baja producción de la proteína ha impedido la observación de respuesta inmune en modelo murino (Sun et al., 2022).

III. Marco Teórico

3.1 La pandemia de SARS-CoV-2

A finales del año 2019, en la provincia de Hubei, China, se registraron los primeros casos de un brote de neumonía “atípica” que se asociaron con una cepa nueva de un nuevo coronavirus (Wu et al., 2020; Zhou et al., 2020; Jackson et al., 2022). La Enfermedad por el nuevo Coronavirus (novel coronavirus disease) fue llamada COVID-19 por la Organización Mundial de la Salud (ONU, 2020), y es provocada por el Virus del Síndrome Respiratorio Agudo y Severo No.2, el SARS-CoV-2, que es un virus envuelto, con genoma de ARN de cadena sencilla que tiene sentido positiva y se ancla a la enzima convertidora de angiotensina ECA-2, la cual se encuentra en las células del sistema respiratorio de los humanos (Santos-López et al., 2021).

Los coronavirus pertenecen a la Familia Coronaviridae y muchos de ellos son patógenos de humanos, tales como: 229E, NL63, OC43, HKU1, que solamente causan infecciones moderadas (Huang et al., 2020). También hay algunos coronavirus que causan infecciones respiratorias severas en humanos, entre ellos se destacan: SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2, que pueden llegar a tener una letalidad del 10%, 37% y 5%, respectivamente (Santos-López et al., 2021).

A finales de 2023, y habiendo iniciado en el 2019, la pandemia por la COVID-19 ha causado la infección de alrededor de 773 449 299 personas en el mundo, según datos del Informe Integral de COVI-19 en México (SALUD, 2023). Así mismo, la Secretaría de Salud calcula que en el mundo han muerto 6 991 842 personas desde el inicio de la pandemia hasta finales de diciembre de 2023 (SALUD, 2023). Según datos del informe antes mencionado, en México el número de personas infectadas desde el inicio de la pandemia hasta finales de 2023 es de 6, 932, 962, habiendo fallecido 333,336 personas (SALUD, 2023).

3.2 Características moleculares del SARS-CoV-2

Los coronavirus poseen un genoma de ARN monocatenario y no segmentado, con alrededor de 30 mil nucleótidos (López-Santos, 2021) (Figura 1). El genoma de SARS-CoV-2 tiene la presencia de una estructura muy parecida a la 7-metil-guanosil-

trifosfato (CAP) de los eucariotas (una modificación postraduccional necesaria para el transporte del ARNm y el reconocimiento de los sitios de unión al ribosoma) (Figura 2), así como una cola Poli-A en el extremo 3', por lo que funciona como un RNAm. Dicho ARN se traduce y genera una serie de proteínas no estructurales que se denominan proteínas no estructurales (NSP, por sus siglas en inglés), cuyas funciones están en la replicación y la maduración de las proteínas estructurales (S, M, N y E) (Pastrián Soto, 2020).

El genoma viral de SARS-CoV-2 tiene 13 marcos de lectura abiertos (ORF) (Zhang, 2021). Los dos primeros marcos de lectura (1a y 1b) codifican para el gen de la replicasa viral y el último marco de lectura (cercano al extremo 3') codifica para un conjunto de cuatro proteínas estructurales, cada una con su propia denominación y función (Pastrián Soto, 2020). Estas incluyen la proteína de la espícula, conocida también por su nombre en inglés "Spike" o simplemente la letra "S", la envoltura, referida como "E", la de membrana, designada como "M", y la nucleoproteína, identificada por la letra "N". Por otro lado, el virus también cuenta con genes de proteínas no estructurales, cuyo número asciende a un mínimo de 16, y son nombradas desde nsp1 hasta nsp16. Las proteínas estructurales son las que forman la estructura básica del virus. La proteína S es la más visible y desencadena una fuerte respuesta del sistema inmunológico; además, es la que da la característica forma de corona al virión. En el caso del SARS-CoV-2, la proteína S se une a la proteína ECA2 (enzima convertidora de angiotensina 2) en las células humanas para infectarlas (López-Santos 2021).

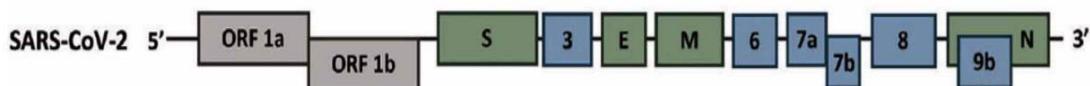


Figura 1. El genoma de SARS-CoV-2 de ARN de cadena sencilla con polaridad positiva (+ssARN). En el extremo 5' del genoma, se encuentra el gen que codifica la replicasa viral, que se traduce a partir de dos marcos de lectura: ORF 1a y ORF 1b. Estos marcos de lectura producen dos poliproteínas llamadas pp1a y pp1ab. En el extremo 3', el genoma tiene los genes para las cuatro principales proteínas estructurales del virus: la de espícula (S), la de membrana (M), la de envoltura (E), y la nucleoproteína (N), representadas en color verde. También en esta región, pero en color azul, están los genes que codifican para las proteínas accesoria. Tomado de Pastrián Soto, 2020.

La proteína N del virión de SARS-CoV-2 protege el material genético del virus y ayuda en la producción de ARN viral. La proteína M mantiene la estructura del virión y la E funciona ayudando a ensamblar y liberar nuevos viriones de las células infectadas (Polack, 2020).

Además de estas proteínas estructurales, el SARS-CoV-2 también tiene segmentos de código genético que producen proteínas "accesorias" como ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8 y ORF9b. Aunque estas proteínas no son esenciales para que el virus se replique si tienen diferentes funciones, como interactuar con las proteínas del cuerpo humano y afectar la respuesta antiviral (Polack, 2020).

En cuanto a las proteínas no estructurales, SARS-CoV-2 tiene 16, entre ellas la helicasa, trifosfatasa, metiltransferasa y nucleasa. Una de las más importantes es la Nsp5, que es una proteasa conocida como Mpro o 3CLpro, que ayuda a madurar 12 proteínas al cortar en 11 puntos específicos del genoma viral (Santos-López, et al., 2021; Jackson et al, 2022; Wrobel, 2023).

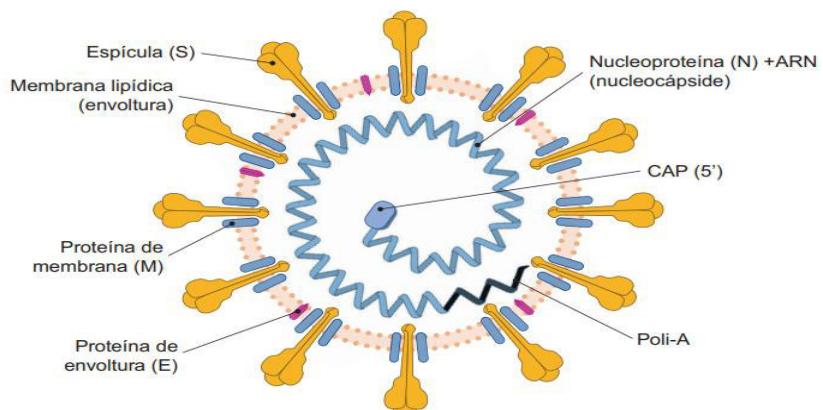


Figura 2. Estructura del virión de SARS-CoV-2 que ilustra las proteínas estructurales y no estructurales, además de la organización CAP y Poli-A del genoma. El virión del SARS-CoV-2 tiene una estructura distintiva. Dentro de la partícula viral, hay una nucleocápside que contiene el ARN genómico, asociado a la proteína llamada N, que es una proteína de nucleocápside, juntas ARN y proteína N forman la nucleocápside. Esta nucleocápside está rodeada por una envoltura externa que alberga las principales proteínas estructurales, como la proteína spike (S), la de membrana (M), y la de envoltura (E). Además de estas proteínas, hay también proteínas accesorias, como la hemaglutinina-esterasa (HE). Tomado de Santos-López et al. 2021.

3.3 Estructura de la proteína S de SARS-CoV-2

La proteína S de SARS-CoV-2 tiene un tamaño aproximado de 120 a 130 kDa, y consta de un extremo N terminal que es extracelular y un segmento C terminal que es intracelular, además posee un dominio transmembrana (TM) que está anclado a la membrana viral (Bosch et al., 2003). La longitud de la proteína S del SARS-CoV-2 es de 1273 aminoácidos y tiene dos subunidades principales: S1 y S2. La subunidad S1 es responsable de unirse al receptor en las células humanas (principalmente la enzima convertidora de angiotensina 2 o ECA2), mientras que la subunidad S2 se encarga de la fusión de la membrana viral con la membrana de la célula huésped, permitiendo al virus ingresar a la célula. De los aminoácidos 1-13, constituyen un péptido señal amino terminal, los aminoácidos 14-685 forman la subunidad S1, mientras que la subunidad S2 está en los residuos 686-1273. En la subunidad S1 hay un dominio N-terminal (residuos 14-305) y un dominio de unión al receptor, RBD, 319-452 aminoácidos. También hay un péptido de fusión (FP), un heptapéptido (HR1), HR2 y el dominio TM, que forman la subunidad S2 (Huang et al., 2020) (Figura 3 y figura 4).

La proteína S es una glicoproteína de membrana muy glicosilada. El gen de la “Spike” de SARS-CoV-2, tiene alrededor de 3,822 nucleótidos. (Zhang et al., 2021).

La razón por la cual la proteína S hace que el virus SARS-CoV-2 sea más específico para el reconocimiento de las ECA-2 del tracto respiratorio superior de los humanos, a diferencia de otros coronavirus humanos como MERS-CoV, es que existen 6 aminoácidos en el RBD de la subunidad S1 de la proteína S, de los cuales, 5 de ellos son diferentes y únicos en el nuevo coronavirus, mientras que en los coronavirus anteriores se mantienen conservados (Andersen et al., 2020). La secuencia presente en SARS-CoV-2, y que no están en los otros coronavirus, es: Y442, L472, N479, D480, T487 y Y4911 (Rangel Núñez, 2021). La alta especificidad para la infección en humanos se debe a que en el sitio de escisión de SARS-CoV-2, presente entre las subunidades S1 y S2, hay una secuencia única PRRA que está flanqueada por sitios de glucanos unidos a oxígeno, en los sitios S673, T678 y S686 (Follis et al, 2006; Andersen et al., 2020). Tanto el sitio de escisión polibásico por furina y los sitios de glucanos unidos a oxígeno no están presentes en los otros coronavirus (Amanat & Kramer, 2020; Rangel Núñez, 2021).

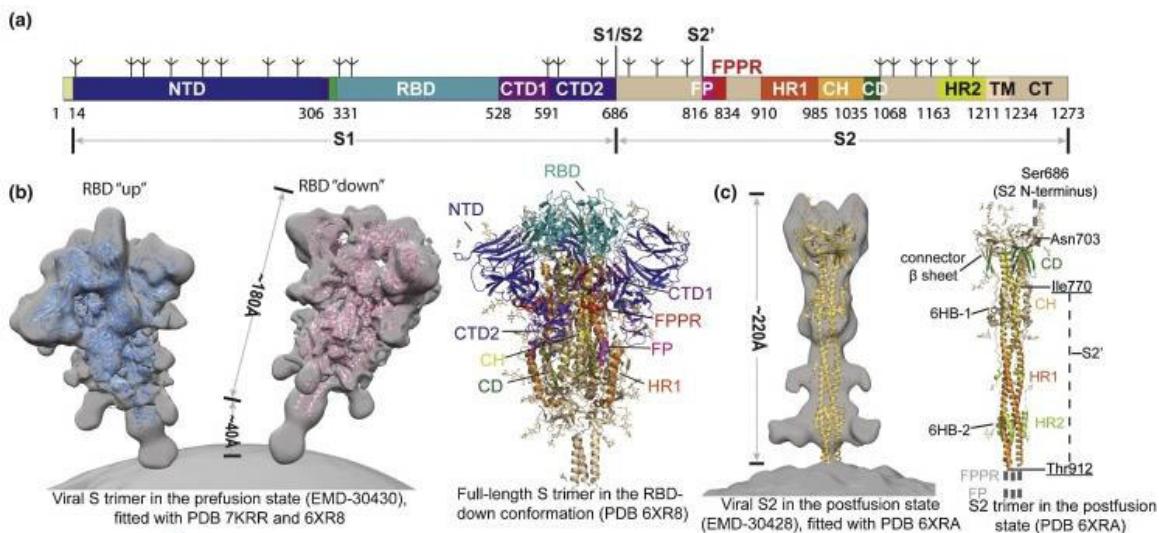


Figura 3. Estructura de la proteína S de SARS-CoV-2. (a) Proteína de espícula (spike) del SARS-CoV-2 tiene varios dominios clave: el dominio N-terminal (NTD), el dominio de unión al receptor (RBD), los sitios de fusión y las repeticiones de heptada. (b) En la conformación prefusión, el trímero de la proteína spike tiene el RBD hacia abajo. En el estado post-fusión, el trímero se reconfigura para facilitar la entrada del virus en las células huésped. (c) Las estructuras de la proteína spike se han determinado mediante cryo-EM y cristalográfia, mostrando diferentes conformaciones, como las variantes con un RBD hacia arriba y otras estabilizadas. Tomado y modificado de Zhang et al., 2021.

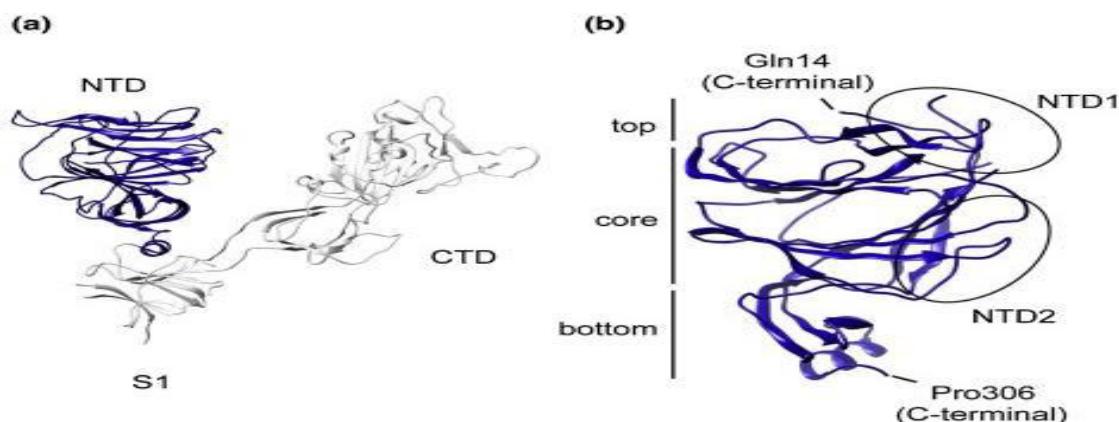


Figura 4. Estructuras del dominio N-terminal NTD de la proteína S del SARS-CoV-2 y sus complejos con anticuerpos. (a) Imagen de Cryo-EM que muestra el fragmento S1 del trímero completo de la proteína spike del SARS-CoV-2 (ID de PDB: 6XR8), donde el dominio N-terminal (NTD) está resaltado en azul y el resto del fragmento S1 en gris. (b) Vista detallada del NTD en la proteína S del SARS-CoV-2. Tomada y modificada de Zhang et al., 2021.

3.4 Ciclo de replicación del SARS-CoV-2

La infección por SARS-CoV-2 empieza cuando el virión se une a una célula hospedadora humana de los sistemas respiratorio o el aparato bucal mediante el reconocimiento del receptor de la enzima convertidora de angiotensina ECA2, debido a la interacción de la subunidad S1 de la proteína S con ECA2. La infección se disemina rápidamente en los tejidos respiratorios debido a que ECA2 es muy abundante en dicho tejido, incluyendo la boca y cavidades nasales (Figura 5). Esta unión es como una llave que encaja en una cerradura, permitiendo que el virus se acerque mucho a la célula, acercando la membrana del virus con la membrana plasmática, tarea debida a la subunidad S2 de la proteína S (Zhang et al., 2021).

Una vez que la proteína spike se une a ACE2, una enzima llamada TMPRSS2 (serina proteasa transmembrana 2), que está presente en la membrana celular, corta la proteína spike, separando sus dos partes: S1 y S2. Esto activa a la subunidad S2, que entonces puede fusionar la membrana del virus con la membrana de la célula. Al fusionarse, el contenido del virus, principalmente su material genético (ARN), entra al interior de la célula (Jackson at al. 2022; Azali et al., 2022). Cuando el ARN del virus entra en la célula hospedadora, comienza la fase de replicación. El ARN utiliza el ribosoma para codificar la replicasa viral (Santos-López et al., 2020).

La replicasa sintetizada por el genoma de SARS-CoV-2 permite que el ARN viral se copie a sí mismo muchas veces, creando más ARN viral. Este proceso es crucial para la propagación del virus, ya que el objetivo es producir muchas copias del virus que luego se liberarán para infectar más células. A medida que se produce más ARN, la célula también sintetiza las proteínas estructurales del virus, como la misma spike, la proteína de membrana (M), la envoltura (E), y la nucleoproteína (N). Estas proteínas y el ARN se ensamblan para formar nuevos viriones, generalmente en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Una vez que los nuevos viriones están listos, se transportan dentro de vesículas hacia la superficie de la célula y finalmente se liberan al exterior mediante exocitosis. Posteriormente, estos viriones pueden infectar otras células, repitiendo el ciclo (Jackson et al, 2022).

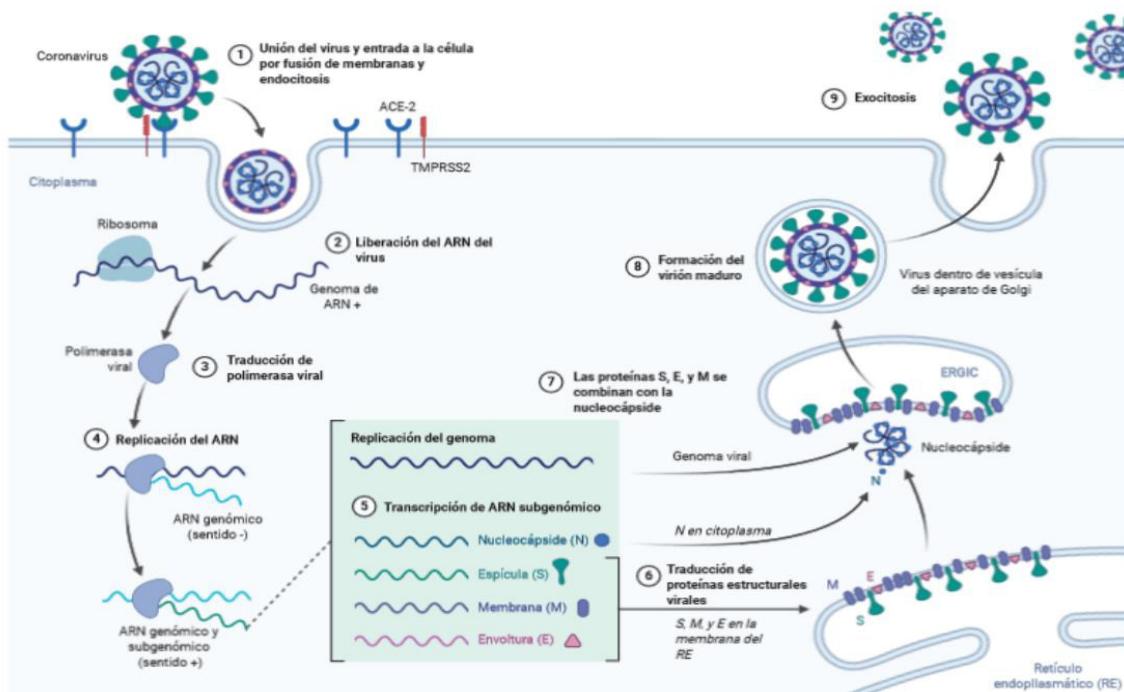


Figura 5. Mecanismo de entrada del SARS-CoV-2 a la célula y su ciclo replicativo. Cuando el virión de SARS-CoV-2 interactúa con una célula hospedera, la subunidad S1 de la proteína S reconoce a la ECA, la subunidad S2 acerca la membrana viral y la membrana celular y la enzima TMPRSS2 realiza la escisión proteolítica de la proteína S. Una vez ha ocurrido esto, el ARN (+) ingresa al citoplasma y hay una replicación del ARN, que genera un ARN viral (-), el cual se traduce en los ribosomas para generar las proteínas pp1a y pp1b (codificadas por el gen de la replicasa viral, que está cerca del extremo 5' en el genoma) y la proteasa viral PLpro y 3Cpro, las cuales digieren a pp1a y pp1b y generan las 16 nsp. Las 16 nssp generan el complejo RTC, el cual sintetiza ARN (+) y este ARN codifica para las proteínas estructurales S, M, N y E. Por último, se da una asociación de las proteínas estructurales, el ARN (+) en el RE y el aparato de Golgi y se sintetizan viriones nuevos que abandonan la célula por exocitosis. Tomada de Jackson et al., 2022.

IV. ANTECEDENTES

4.1 Generación de baculovirus recombinantes *BackSpike*

Se generó un baculovirus recombinante, *BackSpike*, por parte del Dr. Jonatan Carmen Rangel Núñez, del laboratorio de Biotecnología Alimentaria y Vegetal de la División de Ciencias de la Vida, de la Universidad de Guanajuato. Para lo anterior, se utilizó el sistema Bac to Bac. Se partió del plásmido *pTwist EF1 Alpha nCoV-2019-S-2xStrep* (Figura 6), donado por la Universidad de California, y que contenía el gen completo de la proteína Spike (4,000 Pb), a partir de él, se obtuvo la secuencia del gen usando oligonucleótidos específicos y realizando PCR para amplificar únicamente dicha secuencia, y posteriormente se purificó el ADN directamente del gel de agarosa. El diseño de oligonucleótidos para extraer la secuencia completa del gen se encuentra en la tabla 1 (Rangel Núñez, 2021). A la par, se extrajo ADN plasmídico de *E. coli* Topo10 para obtener el plásmido *pFastBac*, necesario para el sistema Bac to Bac. Ambos, ADN plasmídico y ADN purificado de la amplificación del gen de la proteína Spike, se cortaron con la enzima BamHI y se ligaron con la enzima T4 ligasa de Invitrogen; adicionalmente, utilizando el ADN (*pFastBac+ADN* del gen de la Spike) se transformaron células de *E. coli* DH10Bac según las condiciones y cantidades reportadas (Rangel Núñez, 2021). En las células bacterianas transformadas que contienen una copia del genoma del baculovirus *AcMNPV* (Bácmido), se realizó la recombinación homóloga entre los sitios T7nR y TN7L, que flanquean al gen de interés en el plásmido *pFastBac*. Con las secuencias T7n en el Bácmido se insertó la secuencia del gen de la Spike en el Bácmido, sustituyendo al gen de la poliedrina. Posteriormente, se extrajo ADN de las células DH10Bac y con él se co-transfектó la línea celular Sf9 de *S. frugiperda* utilizando cloruro de calcio como acarreador y se observaron los signos de infección. De aquellas placas líticas que contenían células con las características típicas de infección por baculovirus (estroma virogénico, núcleo agrandado e hipertrofiado, membrana celular disgregada) pero sin la formación de cuerpos de oclusión (CO), se purificaron los baculovirus recombinantes (Rangel Núñez, 2021).

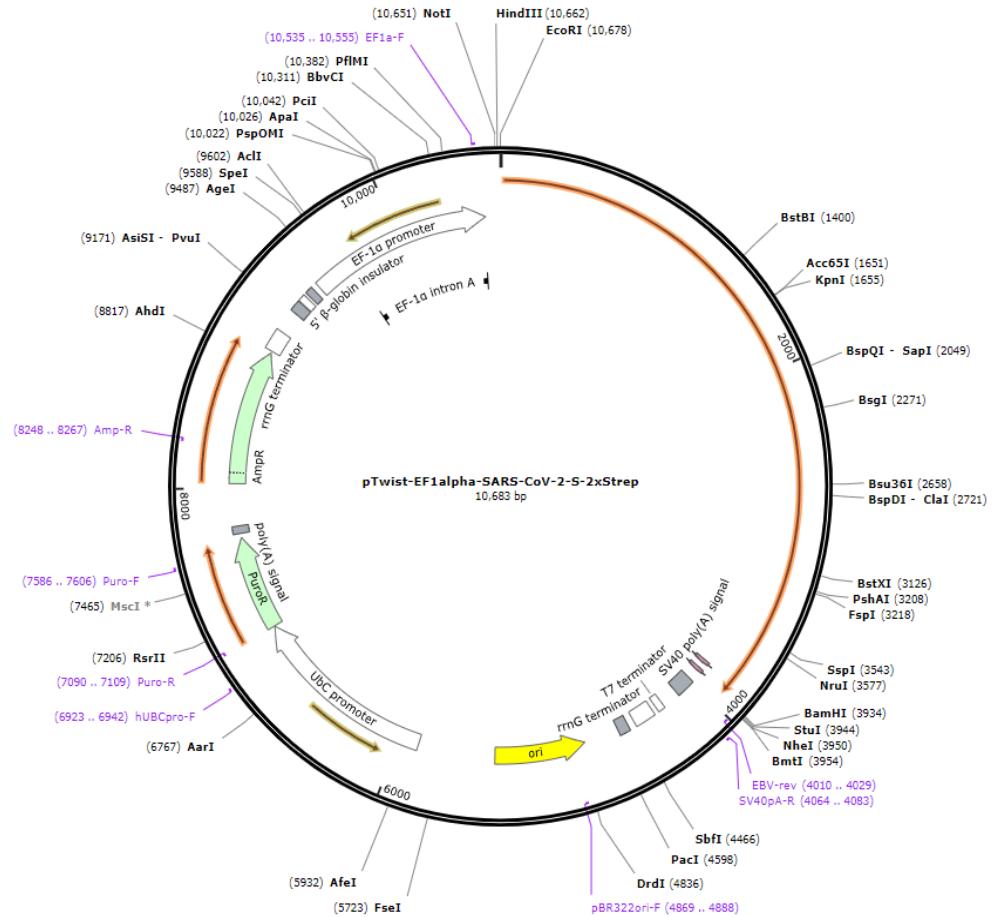


Figura 6. Vector *pTwist EF1 Alpha nCoV-2019-S-2xStrep* con la secuencia de la proteína Spike de SAR-CoV-2.

Tabla 1. Oligonucleótidos para amplificar el gen de la proteína Spike de SARS-CoV-2.

Gen	Oligonucleótido	Longitud Pb	Tm °C	%GC	ΔG hairping °C	Tm hairping °C	ΔG homodímero Kcal/mol	ΔG heterodímero Kcal/mol
Spike								
D	5'CTCGGATCCGCCGCCAC CATGTTTGTTC	30	66	56.7	-2.26	53.1	-17.9	-17.5
R	5'TGCGGATCCTACTTTTC AAACTGCA	25	57.9	44	0.23	22.5	-10.7	

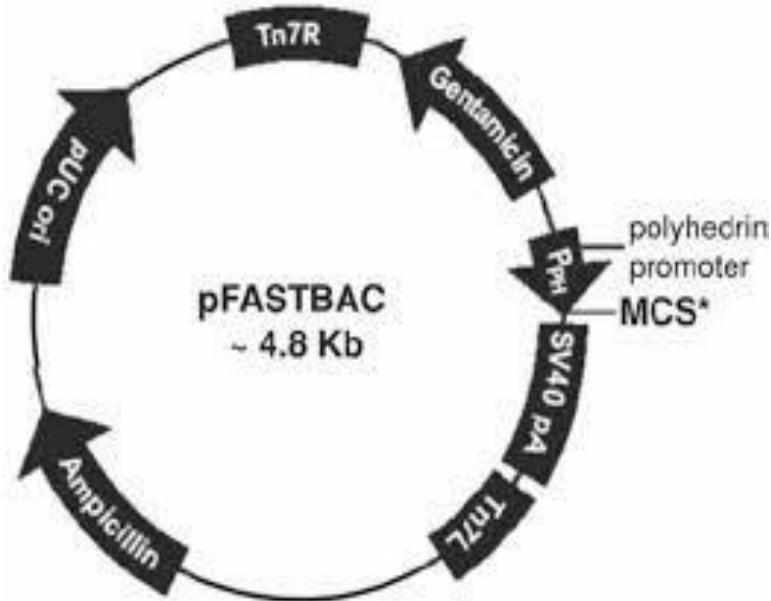


Figura 7. Mapa de *pFastBac*, utilizado en la construcción de los baculovirus recombinantes *BackSpike*. Tomado de Rangel Núñez, 2021.

El gen de la poliedrina fue reemplazado por el gen de la Spike, que, al estar controlado por el promotor de la poliedrina, sería reconocido por los reguladores muy tardíos de baculovirus expresando, de esa manera, el gen de la proteína como si se tratara del gen de la poliedrina, por lo que, en las células infectadas por el recombinante, no se dará la generación de cuerpos de oclusión típicos de los baculovirus. Este recombinante presenta la ventaja de que no es necesario que se le coloque un gen reportero como lo podría ser el gen de la Proteína Verde Fluorescente (GFP), puesto que para proseguir la ruta de infección es viable identificar a las células que presenten la morfología típica de la infección por baculovirus, pero que nunca lleguen a formar cuerpos de oclusión (Rangel Núñez, 2021).

Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar una región entre los dos ORF de las subunidades de la proteína S (S1, sitio de escisión tipo furina, y S2) para detectar la presencia del gen de la Spike, cuyo amplicón es de 1,000 pb. Para determinar el sentido del inserto, que refleja la producción de la proteína, se diseñaron oligonucleótidos para un amplicón de 1,200 pb (Rangel Núñez, 2021).

4.2 *S. frugiperda* como plataforma de producción de viriones

El gusano cogollero del maíz, *S. frugiperda*, es una plaga agrícola originaria de América tropical y subtropical, ahora extendida globalmente (Pashley, 1998). Su ciclo de vida, de 30 a 60 días, incluye cuatro estadios: huevo, larva, pupa y adulto (Capinera, 2008). Las hembras ponen muchos huevos (100-200) en las hojas, que incuban en 2-10 días (Harrison et al., 2019). Las larvas, que pasan por seis instares y causan el mayor daño al alimentarse de diversos cultivos, desarrollan un cabeza marrón oscuro con un diseño en "Y" invertida y completan este estadio en 14-30 días. Luego pupan en el suelo por 7-20 días antes deemerger como polillas adultas con una envergadura de 3-4 cm, viviendo 10-21 días y reiniciando el ciclo al poner hasta 1000 huevos (Capinera, 2008). Controlar esta plaga implica insecticidas, prácticas culturales, cultivos resistentes y control biológico (Day et al., 2017).

Las larvas de *S. frugiperda* son utilizadas en el sistema de Bac to Bac (Felberbaum, 2015) como sistema para la amplificación de viriones que producirán la proteína de interés. Estos sistemas hacen fácil la producción de proteínas y además proteínas con modificaciones postraduccionales similares a las realizadas en los mamíferos en células de insecto, que son cruciales para obtener proteínas funcionales similares a las de mamíferos (Mena et al., 2022). Además, el uso de las larvas de *S. frugiperda* ofrece ventajas en términos de escalabilidad y costos en comparación con cultivos celulares convencionales, ya que permiten producir mucha proteína en poco tiempo (Monteiro et al., 2023).

4.3 Generalidades de los virus

Los virus son entidades moleculares que carecen de metabolismo autónomo, son acelulares, parásitos obligados, constituidos por ARN o ADN como material genético, envueltos en una estructura proteica y que pueden tener asociada una envoltura lipídica (Cann, 2007). La característica distintiva de los virus es tener una envoltura llamada cápside y como característica secundaria es que son parásitos obligados de células que funcionan como hospedadoras (Owen et al., 2014).

Los virus inocuos para el ser humano son usados como agentes de control biológico, el primer insecticida viral se comercializó en USA y se produjo en 1961 para su uso

en algodón (Nicholls, 2008).

Los virus, en sentido amplio, presentan varias estrategias de infección que han adquirido por transición evolutiva, pero los virus entomopatógenos necesitan, obligadamente, ser ingeridos por la especie a la cual infectan. La presencia de cuerpos de oclusión constituye un medio fácil eficaz para detectar la infección por baculovirus, un tipo de virus entomopatógeno formado de ADN (Masson et al., 2019).

4.3.1 Baculovirus

Los baculovirus son un grupo de virus que infectan de manera exclusiva a insectos y no tienen patogenicidad reportada por hospederos humanos ni en otros vertebrados (Shrestha et al., 2018), son usado como agentes de control biológico, y en la generación de sistemas de expresión de vectores para la generación de vacunas humanas, BEVS, por sus siglas en inglés (Hong et al., 2023), y como herramientas para la entrega de genes en la terapia génica (Ono et al., 2018).

Los baculovirus son virus de ADN de doble cadena y son los microorganismos entomopatógenos más usados para el control de insectos plaga porque son inocuos para el ser humano y son muy específicos para infectar insectos de los órdenes *Lepidóptera* y *Díptera* (Hong et al., 2022). Los baculovirus pertenecen a la familia *Baculoviridae* y tienen genomas circulares de ADN bicatenarios que tienen un tamaño aproximado de entre 80 y 180 Kb, dichos genomas son susceptibles de codificar entre 80 y 180 genes (Del Rincón-Castro et al., 2018). Se sabe que generan dos fenotipos de partículas con capacidad infectiva (viriones): viriones derivados de oclusión (ODV) y los viriones gemados (BV), por lo general, en las categorizaciones se tiende a separar a los baculovirus en cuatro géneros principales: *Alphabaculovirus*, *Betabaculovirus*, *Deltabaculovirus* y *Gammabaculovirus* (Thézé et al., 2018).

La infección de baculovirus en larvas de insectos es un proceso de transmisión oral obligatoria que se inicia con la infección de las células del intestino medio a través del virión de fenotipo de virus derivado de oclusión (ODV). La infección secundaria posterior se lleva a cabo mediante el fenotipo de virus gemado (BV) (Shrestha et al., 2019).

4.3.2 Ciclo de infección de baculovirus

El ciclo de infección por baculovirus tiene dos fases (Figura 8), a las cuales se llama infección primaria e infección secundaria (Granados, 1980). Para que exista una infección por baculovirus, esta tiene que ser en las larvas y no en los adultos. Antes que nada, es necesario que los COs sean ingeridos por la larva, estos COs generalmente están contaminando el alimento de las larvas, como las hojas y los tallos (Salvador, 2021). Una vez ingeridos, los COs alcanzan el intestino medio de las larvas donde son procesados por la presencia de un pH alcalino (casi siempre entre 8-12) y esto, combinado con la presencia de proteasas, degrada los COs y libera a los viriones, que en este punto se llaman viriones derivados de oclusión (ODV) (Caballero et al., 2001), que son fenotípicamente distintos, aunque genotípicamente idénticos a los otros viriones, que se llaman viriones brotados (BV) (Salvador, 2021).

Los ODV llegan a una estructura que recubre al intestino medio y que sirve como protección, llamada membrana peritrofica (MP). Hay dos caminos que los ODV pueden seguir: uno es ingresar por unos orificios que tiene la membrana peritrófica (Rangel Núñez, 2014) y llegar a las células epiteliales del intestino medio; el otro camino que pueden tomar es degradar la membrana peritrofica, haciendo uso de una proteína que se conoce como factor potenciador viral (FPV) (Rangel Núñez, 2014).

Una vez que los ODV atraviesan la MP, llegan a las células columnares del intestino medio y se fusionan con la membrana celular de estos, haciendo que las envolturas de los viriones se fusionen con la membrana celular de las microvellosidades y de esta manera las nucleocápsides, que son asociaciones de ADN con proteína de la nucleocápside (NP) y con otras proteínas accesorias como vp12 y VP39, sean liberadas en el citoplasma (Granados, 1980; Rangel Núñez, 2021).

Una vez que las nucleocápsides se fusionan y han entrado a la célula y están dentro del citoplasma, se asocian con los microtúbulos del citoesqueleto y estos llevan al virus hasta al núcleo de las células (Granados, 1980; Rangel Núñez, 2014), en donde se alinean con las proteínas del poro nuclear, y en última instancia con los poros nucleares, y pueden penetrar completas o pueden depositar solamente un complejo que se llama DNP (Granados & Williams, 1986; Rangel Núñez, 2014). Una vez que ha pasado esto, el ADN es liberado en el núcleo, comienzan las alteraciones del citoplasma y de la membrana celular, así como la formación del estroma virogénico

(Grabados, 1980). Se da una primera ronda de replicación y la generación de nuevas nucleocápsides, las cuales pueden ocluirse en un CO y regenerar los ODV. Otro camino es que algunas nucleocápsides pueden adquirir una vesícula de la membrana celular y se transportan a la membrana celular, salen y se dirigen hacia el hemocele, estos viriones son conocidos como viriones brotados, VB, y llevan a cabo la infección de los otros tejidos y la infección secundaria (Rangel Núñez, 2014).

Cuando ya están en la hemolinfa, los BV llevan a cabo la infección secundaria, llegando al núcleo de las células de los tejidos secundarios (como tejido graso, órganos reproductivos y túbulos de Malpighi) y generando dos ciclos de replicación, en el primero se generan más BV; la segunda replicación genera la fase de oclusión, generando los ODV que se van acumulando en COs y estos se agregan y acumulan en el núcleo de la célula, haciendo que esta se lise y se libren los COs, infectando nuevamente la comida de las larvas y reiniciando el ciclo (Ojeda et al., 2002). Cuando hay una infección por baculovirus, las larvas morirán sin remedio y una manera de verificar que la muerte se ha dado, de hecho, por baculovirus, es que las larvas van a las hojas del cultivo que infectan y al morir presentan una especie de V invertida (algunos autores dicen que tiene el símil con una L) y el color de su tegumento es blanquecino (Figura 8) (Williams et al., 2017).

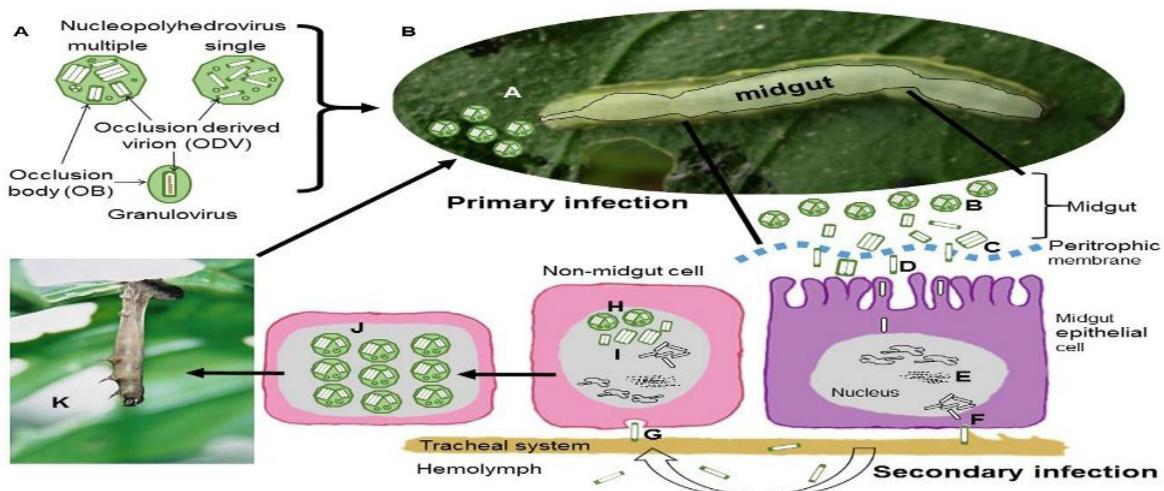


Figura 8. Ciclo de infección primaria y secundaria por baculovirus en lepidópteros. Tomado de Williams et al., 2017. Los baculovirus forman cuerpos de oclusión (COs) que las larvas ingieren cuando contaminan su comida, como hojas, tallos y frutos. Al llegar al intestino medio, por acción del

pH alcalino (8-12) y también por acción de las proteasas intestinales se disuelven los COs y liberan los viriones (ODVs), el primer fenotipo implicado en la infección. Las enzimas asociadas a los COs degradan la membrana peritrófica (MP) (aunque los ODV pueden atravesar la MP por unos orificios presentes en ella, ambas estrategias ocurren), permitiendo que los ODVs entren en las células epiteliales del intestino medio. Dentro de las células epiteliales del intestino medio, los ODVs pueden empezar a replicarse, generando viriones brotados (BV) o moverse hacia la membrana basal y salir como BV. Esto inicia la infección secundaria en otros tejidos del hospedador. Los BV replican su ADN y comienzan a producir la proteína que forma los COs, creando así nuevos COs. En las etapas finales del ciclo, las células se llenan de COs en los núcleos, estos comienzan a agregarse y acumularse en grandes cantidades y finalmente rompen las células infectadas. Cuando la larva muere a causa de la infección viral, los COs se liberan al medio y contaminan el alimento de las larvas, que vuelven a ingerir los COs y se reinicia el ciclo. Cuando una larva ha muerto por infección de baculovirus se observa un característico cambio de color (se ponen blanquecinas) y mueren en posición de V invertida (inciso K).

4.4 Baculovirus como sistemas de expresión de genes

El sistema de expresión de baculovirus, BEVS, por sus siglas en inglés, ha contribuido al desarrollo de la biotecnología roja y la producción de proteínas recombinantes al aprovechar la capacidad natural de los baculovirus para infectar células de insectos. Este sistema, basado comúnmente en el *Nucleopolyhedrovirus* de *Autographa californica* (*AcMNPV*), ofrece una manera útil y eficiente para la expresión de genes de interés en larvas del gusano cogollero del maíz o en larvas del gusano falso medidor de la col, *Trichoplusia ni*, así como líneas celulares como Sf9 y Sf21. Los componentes principales del BEVS incluyen un vector de expresión que se integra en el genoma del baculovirus y lleva el gen de interés, y células de insecto que funcionan y hacen el símil de fábricas de producción masiva de proteínas recombinantes. Además, al ser sistemas eucariotas quienes realizan la traducción de las proteínas, permite la expresión de proteínas complejas con modificaciones postraduccionales como la glicosilación, plegamiento y formación de puentes disulfuro, que son esenciales para la actividad biológica de muchas proteínas humanas (Kost et al., 2005; Jarvis, 2009; van Oers et al., 2015; Felberbaum, 2015). La glicosilación en células de insecto tiende a ser tipo O y las glicoproteínas producidas en estas células a menudo carecen de ácidos siálicos (Jarvis, 2003). Las

células humanas realizan glicosilaciones más complejas del tipo N, y además tienen ácidos siálicos y estructuras ramificadas, lo cual es crucial para la función y reconocimiento de muchas proteínas en el cuerpo humano (Kost et al., 2005).

Un ejemplo notable del uso de sistemas de expresión de baculovirus es la producción de vacunas recombinantes. Las vacunas contra el virus del papiloma humano (HPV), como *Gardasil* y *Cervarix*, se producen utilizando estos sistemas debido a su capacidad para generar partículas similares al virus (VLPs) que inducen una fuerte respuesta inmunitaria (Schädlich et al., 2009). Además, los sistemas de baculovirus se han empleado en la producción de proteínas para terapias génicas y enzimáticas, subrayando su versatilidad y eficacia en biotecnología moderna (Chen et al., 2011).

Uno de los principales usos de estos sistemas fuera del ámbito de las vacunas es la producción de proteínas terapéuticas y enzimas industriales. Por ejemplo, las proteínas de uso terapéutico, como los factores de coagulación utilizados en el tratamiento de hemofilia, se producen eficazmente en sistemas de expresión de baculovirus debido a su capacidad para realizar modificaciones postraduccionales esenciales para la actividad biológica (Aumiller et al., 2012). Asimismo, enzimas utilizadas en procesos industriales, como la celulasa y la lipasa, se producen en estos sistemas debido a su alta eficiencia y capacidad de escalar la producción (Wang et al., 2019). Otra aplicación es la producción de anticuerpos monoclonales. La capacidad de estos sistemas para expresar glicoproteínas complejas hace que sean ideales para la producción de anticuerpos con las modificaciones necesarias para la eficacia terapéutica (Liu et al., 2020).

Los baculovirus recombinantes son herramientas poderosas en biotecnología y producción de proteínas recombinantes. Estos virus son ampliamente utilizados como sistemas de expresión heterólogos debido a su capacidad para producir proteínas en grandes cantidades y con adecuada glicosilación y plegamiento proteico (Smith et al., 2020).

Además de su eficiencia en la expresión de proteínas virales, los baculovirus recombinantes ofrecen ventajas en términos de seguridad y calidad del producto final. Estos virus no son patógenos para los humanos, y seguramente no serán, y se consideran seguros para la producción de proteínas destinadas a aplicaciones médicas y biotecnológicas (Martins et al., 2020).

4.4.1 Tipos de vacunas y vacunas a base de baculovirus

Los principales tipos de vacunas difieren entre sí por la manera casuística de producir la respuesta inmunitaria y no por la respuesta misma. Existen vacunas que utilizan patógenos atenuados, pero vivos, las llamadas vacunas de virus atenuados; otras vacunas utilizan al patógeno que ha sufrido un tipo de inactivación (generalmente por métodos físicos como el calor) y son las vacunas de virus inactivados, que introducen virus “muertos”; también están las vacunas que utilizan el material genético del virus y se conocen como vacunas de ARN, y por ultimo existen las vacunas que utilizan solamente una parte del virión y no a la partícula viral como sistema holístico, están son las vacunas de partes o vacunas de subunidades y generalmente usan la proteína más inmunogénica del virión (Xia et al., 2021)

La necesidad de contar con métodos rápidos y efectivos que ofrezcan la posibilidad de una respuesta rápida contra las pandemias ha llevado los baculovirus como una plataforma biotecnológica de vanguardia (Seo et al, 2020). Este enfoque ha cobrado impulso gracias a su seguridad, eficacia y versatilidad en la expresión de antígenos, representando un hito crucial en la fabricación global de vacunas. La utilización de baculovirus en la producción de vacunas se fundamenta en su habilidad para actuar como vectores de expresión de proteínas recombinantes (Lu et al., 2012). A diferencia de los sistemas tradicionales basados en células animales o bacterias, los baculovirus permiten la producción eficiente de antígenos específicos en sistemas celulares de insectos (Irons et al, 2018). Este método ha demostrado ser particularmente efectivo para la expresión de proteínas complejas y glicoproteínas, elementos esenciales en el desarrollo de vacunas contra enfermedades virales. Un ejemplo destacado en este ámbito es la fabricación de vacunas contra la influenza porcina y la influenza estacional, mediante el uso de baculovirus (Kumar et al., 2018). En comparación con las técnicas convencionales que emplean huevos de gallina para la producción de la vacuna contra la gripe, la plataforma de expresión de baculovirus proporciona una alternativa más ágil y adaptable y no genera residuos de proteínas que pueden ser tóxicas para algunas personas immunocomprometidas (Felberbaum, 2015). Empresas farmacéuticas como Novavax, han adoptado esta tecnología para producir vacunas contra la influenza de manera más eficiente y responder rápidamente a las cepas cambiantes del virus (Seo et al., 2020).

vacuna contra la influenza de Novavax, conocida como NanoFlu, ha empleado esta plataforma de baculovirus para expresar las proteínas antigenicas, resaltando la relevancia práctica de esta tecnología en la producción de vacunas estacionales (Choy et al., 2022). Además de su versatilidad, los baculovirus son totalmente seguros, puesto que la incapacidad de estos virus para replicarse en células humanas, combinada con la ausencia de elementos virales persistentes en los productos finales, minimiza los riesgos asociados con la contaminación viral. Este atributo es particularmente crucial en la fabricación de vacunas, donde la seguridad y la pureza son consideraciones prioritarias (Azali et al, 2022; Hitchman et al., 2011).

4.4.2 Flublok: un ejemplo exitoso de vacunas a base del sistema de baculovirus

La vacuna Flublok fue diseñada para combatir la influenza estacional y es un importante avance en la tecnología de vacunas gracias a su novedoso método de producción que utiliza el sistema de expresión de baculovirus. Desarrollada por la empresa farmacéutica Protein Sciences Corporation, posteriormente adquirida por Sanofi Pasteur. La tecnología de baculovirus empleada en Flublok implica el uso de un vector viral derivado del baculovirus de *Autographa californica* (AcMNPV). Este vector se manipula genéticamente para portar el gen de interés, en este caso, la secuencia genética que codifica la proteína de superficie del virus de la influenza (hemaglutinina A), una proteína de superficie viral esencial para la entrada del virus de la influenza en las células hospedadoras. La producción de Flublok comienza con la introducción del gen de la hemaglutinina en las células de insecto, usando para esto la línea celular Sf9 derivadas de *T. ni*. Estas células son infectadas con el baculovirus recombinante para llevar el gen de HA (Cox et al., 2008). Una vez infectadas las células de insecto, se inicia un rápido proceso de replicación viral y expresión de la proteína HA. Posteriormente, esta proteína es purificada y utilizada para la inmunización. La ventaja crucial de este enfoque radica en la capacidad de producir grandes cantidades de proteína viral en un sistema celular de insecto, proporcionando así una alternativa eficiente y escalable a los métodos de producción tradicionales que utilizan huevos de gallina (Felberbaum, 2015). La eficacia de Flublok ha sido respaldada por estudios clínicos que han demostrado su capacidad para inducir respuestas inmunitarias robustas y proporcionar protección contra las

cepas circulantes de la influenza (Cox, 2008).

Hay varias ventajas al utilizar el sistema BEVS: en primer lugar, el proceso de producción prescinde del cultivo de virus vivos y de la adaptación a huevos de gallina, lo que acelera significativamente la producción y permite una respuesta más rápida a las cepas emergentes del virus de la influenza. Además, al no contener virus vivos, elimina el riesgo potencial de replicación viral en los receptores de la vacuna, finalmente y como se ha mencionado anteriormente, en los insectos hay modificaciones postraduccionales muy parecidas a las realizadas en mamíferos, que sería imposible obtener en sistemas bacterianos (Cox et al., 2008).

V. JUSTIFICACIÓN

La pandemia de la COVID-19 ha generado una demanda urgente de vacunas eficaces y seguras. AstraZeneca, una de las vacunas autorizadas para uso de emergencia, enfrentó retos significativos relacionados con la seguridad, lo que llevó a su retirada del mercado en la mayoría de los países europeos, así como a suspender los permisos para su fabricación de manera definitiva (Robbins, 2024). Este incidente, aunado a los reportes que señalan que algunas vacunas se han estado asociando con la aparición de reacciones adversas (Muir et al., 2021) y sistémicas, como fiebre, dolor en el lugar de la inyección, fatiga y dolor de cabeza (Polack et al., 2020), aunque también se han reportado casos de trombosis debida a trombocitopenia (Greinacher at al., 2021). Todo lo anteriormente señalado resalta la necesidad de desarrollar plataformas de producción de antígenos que puedan garantizar una producción segura y eficiente de proteínas virales, como la proteína S del SARS-CoV-2, para la producción de vacunas. El sistema de expresión de baculovirus recombinante en células de *S. frugiperda* ofrece una plataforma prometedora debido a su capacidad para producir proteínas correctamente plegadas y funcionales, lo que puede facilitar la producción y purificación de antígenos virales para vacunas (Martins et al., 2020). Este enfoque podría contribuir significativamente a la producción de vacunas más seguras y efectivas contra la COVID-19.

VI. HIPÓTESIS

La expresión de la proteína S del SARS-CoV-2 utilizando un baculovirus recombinante en células de *S. frugiperda* permite la producción eficiente de la proteína viral, la cual puede ser purificada y utilizada para inducir una respuesta inmune en ratones, demostrando su capacidad antigenica y su potencial como candidato a desarrollo de vacuna.

VII. OBJETIVOS

Objetivo general:

Caracterizar a nivel biológico y molecular el baculovirus recombinante *BackSpike*, que expresa la proteína Spike de SARS-CoV-2, y determinar el potencial inmunogénico de la proteína en una prueba rápida en ratones.

Objetivos específicos:

1. Amplificar el baculovirus recombinante BackSpike en insectos vivos de *S. frugiperda*, determinar la expresión del gen S y la dirección del inserto para la generación de la proteína S.
2. Analizar la expresión de la proteína S en geles de SDS-PAGE, purificarla e identificarla.
3. Determinar la producción de anticuerpos contra la proteína S del SARS-CoV-2 en una prueba rápida en un ratón vivo.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Producción masiva de *S. frugiperda*

El protocolo utilizado para el establecimiento y mantenimiento de la colonia de *S. frugiperda* es el descrito por Rangel Núñez, 2014:

Para instalar la colonia de *S. frugiperda*, se utilizaron individuos de una colonia, generada en el laboratorio, en etapa de pupa, manteniéndolos en un insectario con una humedad relativa del 80%, a una temperatura de 25°C y con un ciclo de luz y oscuridad de 16:8 horas. Se colocaron dentro de bolsas de papel estraza. Cuando los adultos emergieron, se les proporcionó una solución de agua destilada en una caja de Petri con un 5% de miel de maíz, la cual se pone en un trozo de algodón para que puedan alimentarse. Después de que todos los adultos salen de sus pupas, se eliminan los restos de estas.

Los adultos ponen sus huevos en las paredes de las bolsas de papel. Cada tres días, se retiran los huevos, y para hacerlo, se transfieren los adultos y su alimento a una bolsa nueva. Usando el fototropismo negativo, se coloca la bolsa nueva sobre la antigua, y se espera a que los adultos se trasladen. Una vez que todos están en la nueva bolsa, se recortan los grupos de huevos y se colocan en una caja de Petri con una dieta artificial para *S. frugiperda* (que contiene, para 1 L de dieta, 1 L de agua destilada, 12.5 g agar bacteriológico, 120 g de maíz, 50 g de levadura, 5 g de germen de trigo, 25 g de polvo de espiga de maíz, 2.5 g de ácido sórbico, 2.5 g de ácido ascórbico, 3.125 g de metil paraben, 8.75 g de mezcla de sales, 62.5 g de frijol soya, 3.125 mL de formaldehido al 37%, 0.75 mg de antibiótico y 18.75 g de mezcla de vitaminas) hasta la eclosión.

Después de que los huevos eclosionen (3-5 días), se alimenta a las larvas en la misma caja de Petri hasta que alcancen el segundo estadio larval (4-6 días). Dado que en esta etapa desarrollan hábitos canibalísticos, se colocan de manera individual en vasos de plástico con tapa (10-12 días) y dieta artificial, permaneciendo allí hasta que pasen a la etapa de pupa (7-13 días), bajo las mismas condiciones del insectario.

8.2 Infección de larvas de *S. frugiperda* con *BackSpike*

Debido a que al baculovirus recombinante *BackSpike* se le ha eliminado el gen de la poliedrina, la amplificación de los viriones no se realizó mediante alimentación por goteo, sino que se hizo por medio de inyección, para esto, se tomaron 200 μ L de los viriones en un tubo Eppendorf estéril y mediante la utilización de una jeringa para insulina, también estéril, se inyectaron en la parte del abdomen de las larvas de *S. frugiperda* de tercer instar. Dichas larvas fueron colocadas en condiciones de insectario, colocando de 5-8 larvas por cada caja de Petri con dieta artificial, durante 5 días.

8.3 Verificación de infección por *BackSpike* en larvas de *S. frugiperda*

Para realizar el seguimiento de la infección, se monitorearon las larvas en las que se realizó la amplificación de los viriones del *BackSpike* a las 24, 48 y 72 horas post infección (h.p.i). Se analizaron patrones de color, motilidad y reacción ante estímulos mecánicos, para esto, se usó un palillo de madera estéril con el que se estimularon cada una de las larvas contenidas en la dieta. Las larvas que se encontraron muertas o con poca o nula motilidad y reacción se utilizaron para la extracción de ADN, aquellas que no presentaron signos de infección se dejaron en la caja con las condiciones de insectario. Se descartaron las larvas que llegan al estado de pupa, debido a que es un indicio directo de que la infección no se llevó con éxito.

8.4 Extracción de ADN de larvas de *S. frugiperda*

Para la extracción de ADN de larvas en las que se hizo la amplificación del virus *BackSpike*, se tomaron las larvas y se colocaron en un tubo Eppendorf estéril, agregando 400 μ L de buffer de proteinasa K pH=8 (0.01 M Tris, 0.005 M EDTA, 0.5 % SDS, pH 7.8) y 10 μ L de proteinasa K (1mg/ml), posteriormente se incubaron a 60°C durante 30 minutos en un termoblock marca Selec BioProducts modelo SBD110. Una vez salido del termoblock, se maceraron las larvas con un palillo estéril y se le agregaron 400 μ L de Fenol-Clorforormo alcohol isoamílico 24:25:1 y se centrifugaron las muestras a 14, 000 rpm durante 10 min. Una vez terminada la primera centrifugación, el contenido de la fase superior se colocó en otro tubo

Eppendorf estéril y se le agregaron 400 µL de alcohol isopropílico, se realizó una nueva centrifugación a 14,000 rpm durante 10 minutos. Terminada la segunda centrifugación, se decantó el contenido del sobrenadante y a la pastilla formada se le agregaron 400 µL de etanol absoluto, se realizó una tercera centrifugación a 14,000 rpm durante 8 minutos. El contenido obtenido se almacenó en ADE (30 µL) a 4°C y se tomaron alícuotas de 10 µL para la verificación de la obtención de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa.

8.5 Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Para la demostración de que había ADN en las muestras obtenidas y que estaba en buen estado, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%: se colocaron 0.8 g de agarosa (Thermoscientific TopVision Agarose) en un matraz Erlenmeyer al cual se añadieron 100 mL de TAE 1x, la mezcla se agitó manualmente y se colocó en microondas para la correcta disolución. Una vez enfriado el gel se hizo una electroforesis, para lo cual se tomaron 1 µL de cada muestra y se mezclaron con 1 µL de buffer de carga (999 µL de Organe Juice más 1 µL de Gel Red) y con 1 µL de marcador de peso molecular (1 Kb plus) se corrieron por 30 minutos a 90 V en un gel de agarosa al 0.8 %, en una cámara de electroforesis Mini-sub cell GT marca Bio Rad y se analizó en un transiluminador (Gel Doc Ez, Bio Rad).

8.6 Extracción de ADN de hemocitos de larvas con signos de infección

A las larvas vivas, pero con signos de infección por baculovirus, se les extrajo hemolinfa para el seguimiento de la correcta amplificación del recombinante *BackSpike* y para la obtención de viriones para posteriores amplificaciones. Para ello, se tomaron 0.001 g de glutatión y se colocaron en un tubo Eppendorf estéril con 1 mL de TE, para obtener glutatión al 0.1%. Posteriormente se realizó la extracción de hemolinfa, tomando una jeringa estéril de insulina y realizando incisiones sobre el pie de la larva, de modo que el contenido se concentre en el glutatión. Las larvas se colocaron de nuevo en la dieta artificial y se mantuvieron en condiciones de insectario, evaluando los signos de infección antes mencionados cada 24 h.

Obtenida la hemolinfa (72 h.p.i), se centrifugaron las muestras a 2,500 rmp durante

10 minutos para eliminar las células y tener solamente los hemocitos en la pastilla y en el sobrenadante el ADN. El sobrenadante se separó y se colocó en un nuevo tubo Eppendorf estéril, mientras que la pastilla se suspendió en una cantidad minoritaria del propio sobrenadante y se observó a microscopio utilizando 10 μ L. Del sobrenadante, se tomaron 200 μ L para la extracción de ADN con el protocolo antes mencionado.

8.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para buscar la presencia del gen de la proteína S en el baculovirus *BackSpike*, se diseñaron oligonucleótidos que amplificaran entre los marcos de lectura de cada uno de los genes de las subunidades de la proteína, incluyendo el sitio de escisión tipo furina. Según SnapGen el fragmento predicho debe ser un amplicón de 1,000 pb. Los oligonucleótidos utilizados para ello fueron:

1. Directo: **Spike D 5'-CTGGGATCCGCCGCCACCATGTTGTTTC-3'**
2. Reverso: **Spike R 5'-TGC GGATC CCT ACT TTTCAAAC TGC-3'**

Las condiciones para la amplificación fueron de: 95°C por 5 minutos, 95°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos, 72°C por 1.5 minutos y 72°C por 5 minutos.

La dirección del inserto del gen se determina con un amplicón de 1,200 Pb, y utilizando los oligonucleótidos específicos:

1. Directo: **PolProm D 5'-CTGGAAGGGAAGCAAGGTAAT-3'**
2. Interior: **SpikelInt D 5'-GATATTGGGAAGCGTACGATAG-3'**

Las condiciones para la amplificación fueron de: 95°C por 5 minutos, 95°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos, 72°C por 1.5 minutos y 72°C por 5 minutos.

8.8 Extracción total de proteína de hemocitos

A partir de la pastilla obtenida de la centrifugación de hemolinfa, esta se suspendió en 50 μ L de un buffer de lisis compuesto por 8 M de urea, 2 M de tiourea, 0,5% de CHAPS, 1 mM de DDT y 1 mM de PMSF. Esta suspensión se mezcló en un vórtex durante 15 segundos cada 10 minutos durante un período total de 30 minutos, repitiendo este proceso en intervalos regulares mientras se mantiene en hielo.

Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 13,200 rpm durante 30 minutos, y finalmente se recuperó el sobrenadante.

8.9 Extracción de proteína total de larva de *S. frugiperda*

En un tubo Eppendorf con buffer de lisis (Urea 8M, Tiourea 0.5 % 2M, CHAPS 0.5 % 2M, DDT 1mM y PMSF 1mM) se añaden 10 µL de PMSF. Luego, se tomaron 500 µL de la mezcla del tubo con y se transfirieron a un tubo que contiene larvas muertas y maceradas (previamente tratadas con glutatión al 0.001 %). Se agitaron las muestras en un vórtex durante 10 segundos y se dejaron en refrigeración durante 10 minutos, seguido de otra agitación en vórtex durante 1 minuto. Este ciclo se repitió cuatro veces. Una vez completados los ciclos, se centrifugaron las muestras a 13,200 rpm durante 30 minutos. Después de la centrifugación, se retiró la fase acuosa (proteínas), se colocó en un tubo estéril y se realizó una segunda centrifugación a 13,200 rpm durante 30 minutos, se obtuvo el sobrenadante y las muestras se congelaron a -4°C.

8.10 Cuantificación de proteína por Nanodrop

La cuantificación de las proteinas se llevó a cabo usando un Nanodrop y utilizando como blanco el buffer de lisis. Para cada muestra de proteína se realizaron diluciones 1:10, 1:100, 1:1000.

8.11 Electroforesis en una dimensión (SDS-PAGE)

Para determinar la presencia de la proteína Spike en el baculovirus *BackSpike*, se realizó la electroforesis SDS-PAGE, un gel discontinuo de poliacrilamida en una cámara vertical de electroforesis Mini-Protean Tetra Cell de BioRad. El gel separador se preparó al (12 %) y se usaron 2.607 mL de agua destilada estéril, 1.5mL de Tris 1.5 M pH 8.8, 1.8 mL de acrilamida (40 %), 60µL de SDS 10 %, 3 µL de TEMED y 30 µL de persulfato de amonio 10 %. Cuando el gel polimerizo, se preparó en la parte superior el gel concentrador al 4 %, con 1.518 mL de agua destilada estéril, 630 µL de Tris 0.5 M pH 6.8, 312.5 µL de acrilamida (40 %), 25 µL de SDS 10 %, 2.5 µL de TEMED y 12.5 µL de persulfato de amonio 10%.

15 µg de las muestras de proteínas obtenidas se mezclaron en solución de Laemmli 4X (277.8 mM Tris-HCl pH 6.8, 44.4 % (v/v) glicerol, 4.4 % SDS, 0.02 % azul de bromofenol, 15% β-mercaptoetanol), utilizando 1 µL de solución por cada 3 µL de muestra. Las muestras de proteínas se analizaron en la cámara vertical Mini-Protean Tetra Cell de BioRad y se agregó el buffer de corrida SDS-PAGE (250mM Tris base, 1.92 M Glicina, 1 % SDS, pH 8.8) a 90 volts por 30 minutos y 120 volts por 1.5 h. Los geles se tiñeron con solución de Coomassie (0.25 % azul brillante de Coomassie G-250, 45 % metanol, 9 % ácido acético, 46 % agua) durante 10 minutos bajo agitación suave, posteriormente se destiñeron con 7.5 % ácido acético, 5 % metanol, 87.5 % agua y se observaron en una foto documentador (Gel Doc™ EZ Imagen, BioRad).

8.12 Purificación de la proteína S de SARS-CoV-2

Se realizó un protocolo para enriquecer el tamaño deseado de proteínas de 65-70KDa:

El extracto crudo de proteínas totales extraídas de las larvas con signos de infección con el *BackSpike* se centrifugó a 1000 G durante 10 minutos, tras la centrifugación, se tomó el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo; dicho tubo se centrifugó a 5000 G durante 15 minutos, se tomó el sobrenadante en un tubo nuevo y se centrifugó a 15000 G durante 30 minutos. El nuevo sobrenadante se colocó en un tubo nuevo y se incubó a 45°C durante 10 minutos, para finalizar con una centrifugación a 10000 G por 10 minutos.

Para obtener la banda de interés de la proteína S, se identificaron una o varias bandas con un peso de alrededor de 130 kDa y las bandas correspondientes de 65-70 KDa que indican las dos bandas en las que la proteína S se escinde en el proceso de infección, en geles de poliacrilamida

8.13 Mantenimiento del ratón hembra de cepa BALB/c para prueba rápida

Para poder analizar la capacidad antigenica de la proteína S, se utilizó un sistema de ratón para prueba rápida para la inoculación de la proteína y la medición de la producción de anticuerpos, siguiendo una modificación a los protocolos de Montes et al., 2012 y de Rojas-Anaya et al., 2015:

Se usó un ejemplar de ratón hembra de cepa BALB/c de 32 días de edad, el cual se alojó en jaula a una temperatura controlada de 22 °C (+/-3) con una humedad promedio entre 45 % y 70 %, sometidos a ciclos de luz y oscuridad de 12 horas. Se le proporcionó acceso libre al agua y se les suministró alimento balanceado cada tercer día, en porciones de 5 gramos.

Todos los usos del ejemplar están de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

8.14 Inmunización del ejemplar de ratón hembra BALB/c para prueba rápida

El protocolo para la inmunización de los ratones usados para la inoculación de la proteína S de SARS-CoV-2, fue proporcionado por la Dra. Elizabeth Reyes Martínez, de la División de Ciencias Naturales y Exactas, de la Universidad de Guanajuato, descrito por Nieto, 2016:

Se administró una cantidad de 25 mg (100 µL) de la proteína del extracto obtenido de larvas de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike* con 100 µL del adyuvante de Freud (que contiene 1 mg de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, ATCC 25177 termoinactivado y seco, 0,85 ml de aceite de parafina y 0,15 ml de monooleato de manida) en proporción proteína adyuvante 1:1 (V/V). La inoculación se realizó por vía intraperitoneal teniendo en cuenta el protocolo de manejo veterinario para la toma de animales de laboratorio: Inocular la solución con una jeringa y aguja de 25G o 27G. Mantener la aguja en un ángulo de 45 grados para la inyección intraperitoneal y causar el mínimo estrés y dolor posibles al ejemplar.

Se realizaron en total de 3 inmunizaciones, teniendo una separación de 14 días entre la primera inmunización y la segunda; y un total de 7 días entre la segunda inmunización y la tercera, siendo sacrificado el ejemplar al día 28 de la primera inoculación.

8.15 Seguimiento post inmunización y medición de características nociceptivas del ratón hembra BALB/c

Se monitoreó al ejemplar de ratón para medir las características nociceptivas: temperatura corporal, reacción ante estímulos mecánicos, tiempo de contracción de

pupilas por reacción a luz blanca y peso. Todos los síntomas nociceptivos fueron medidos cada tercer día a partir del día de la primera inmunización. Cada dato de características nociceptivas se compuso de tres mediciones, por ejemplo: en cada día que se midió el peso, la medición se repitió tres veces, y así para las otras características analizadas en el presente trabajo.

8.15.1 Obtención de suero pre inmune de ratón hembra de la cepa BALB/c

El día de la primera inmunización, y previa a ella, se obtuvo de la cola del ratón hembra 100 µL de sangre para la obtención de un control negativo (suero pre inmune). Para la obtención de dicho suero, se hizo lo siguiente: se tomó el animal sujetando el primer tercio de la cola cercano a la cauda y se tomó de la cabeza por la parte posterior, con unas tijeras se cortó la cola y se colocó el volumen mencionado de sangre en un tubo Eppendorf estéril, una vez obtenida la muestra de sangre, el animal se sacrificó por dislocación cervical. Posteriormente, la muestra fue llevada a centrifugar durante 10 minutos a 1000 rpm, para separar el suero (parte superior) de los elementos formes de la sangre. La muestra se suero se guardó a -4° C.

8.16 Determinación de los niveles de anticuerpos del ratón hembra de la cepa BALB/c

La determinación de los niveles de anticuerpos se realizó mediante el Ensayo de inmunoadsorción Ligado a Enzimas (ELISA). Para esto, se colocaron 50 µL de antígeno (proteína S) en los pozos de la placa, para llegar a una concentración de 25 µg/mL en PBS 1X pH 7.4 y se dejó toda la noche a 4 °C. Posteriormente se preparó una solución de bloqueo, usando 30 mL de PBS 1X pH 7.4 y disolviendo en ella 3 g de leche en polvo. Una vez hecho lo anterior, se pusieron 100 µL de PBS-Tween (0.05 %) (preparado con 15 µL de Tween 20 en 30 mL de PBS 1X pH 7.4) en cada pozo de la palca usada para el ensayo de ELISA durante 3 minutos en agitación constante para lavar los pozos y se desechó el contenido, esto se repitió tres veces; seguidamente, se añadieron los sueros pre inmune e inmunizado obtenidos con anterioridad (haciendo uso de diluciones 1:100, 1:300, 1:900, 1:2700, 1:8100, 1:24300 y 1:72900), y se dejó la placa 1h en agitación. Terminado lo anterior, se

realizaron tres lavados con 100 µL de PBS-Tween (0.05 %) durante tres minutos, y se agregó el segundo anticuerpo (Ch-c-po) a una dilución 1:1000 en PBS-Tween (0.05 %) y se llevó a agitación durante 1h. Una vez terminada la incubación con agitación constante, se realizaron otros tres lavados de la placa usando 100 µL de PBS-Tween (0.05 %) durante 3 minutos, cuando se cumplió el tiempo, a cada pozo se le agregaron 100 µL de solución de revelado (0.165 g de ácido de sal diamónica, ABTS, en 10 mL de amortiguador de citrato-fosfato pH 5.0 y 10 µL de peróxido de hidrogeno al 30 %) y se incubó a temperatura ambiente cubierta con papel aluminio y en agitación, y se observó cada 5 minutos para posteriormente hacer la lectura a 450 nm.

8.16.1 Laparotomía y análisis del bazo del ejemplar murino

Con el fin de precisar el estado del bazo y de las placas de Peyer después del experimento, y después del sacrificio del animal, se procedió a realizar una biopsia, para ello se colocó el ratón en papel y se pegó con cinta adhesiva de sus extremidades, con un bisturí limpio se realizó una laparotomía mediana vertical para tener acceso al peritoneo, el cual se despegó con cuidado de preservar los órganos internos en buen estado. Con la ayuda de una pinza metálica limpia se extrajo el bazo y se analizaron visualmente las placas de Peyer. Adicionalmente, se midió el tamaño longitudinal del bazo y se determinó su volumen colocándolo en un volumen conocido de PBS y midiendo el volumen desplazado.

Una vez terminado el procedimiento de laparotomía, el bazo se guardó en PBS en refrigeración y los restos del cadáver del animal se guardaron en congelación a -4° C.

8.17 Análisis estadístico

Los datos generados a partir de la medición de las características nociceptivas fueron analizados utilizando una regresión lineal simple, la correlación de Pearson y un análisis gráfico puntual de las relaciones matemáticas, con el fin de identificar patrones de relación entre las variables dentro del único ejemplar disponible para la prueba rápida.

La selección de estos métodos corresponde a la naturaleza exploratoria del estudio y

a la limitación metodológica impuesta por el tamaño de muestra ($n=1$). En estadística inferencial, la validez de pruebas como t de Student, ANOVA o pruebas no paramétricas depende de la existencia de una muestra suficientemente grande que permita estimar la variabilidad poblacional y el cálculo de error estándar. En ausencia de repetición, cualquier intento de aplicar pruebas de significancia sería metodológicamente incorrecto y conduciría a conclusiones espurias.

El hecho de solamente tener un ejemplar de prueba rápida incapacita la utilización de métodos estadísticos para la revisión de las diferencias significativas (que es, en palabras legas, ver si los cambios en las relaciones de las funciones analizadas no se deben al azar, sino que están relacionados con el tratamiento).

Por tanto, se optó por un enfoque descriptivo y correlacional, que, si bien no permite inferencias causales ni generalizaciones estadísticas, si proporciona una base válida para observar tendencias, generar hipótesis y establecer relaciones preliminares entre variables.

La interpretación de los resultados de la prueba de Pearson se validó usando el criterio de De la Vara Salazar, 2007:

Tabla 2. Criterio del valor de la correlación r de Pearson para la determinación de correlación en las características nociceptivas del ejemplar murino de la cepa BALB/c. Modificado de De la Vara Salazar, 2007.

Valor de r (Pearson)	Interpretación
0.00 a ± 0.29	◊ Correlación débil o casi nula
± 0.30 a ± 0.59	◊ Correlación moderada
± 0.60 a ± 0.84	◊ Correlación fuerte
± 0.85 a ± 1.00	◊ Correlación muy fuerte

El análisis de correlación de Pearson, la correlación lineal y las gráficas se elaboraron haciendo uso del software Stat Graphics Centurion 18.

IX. RESULTADOS

9.1 Establecimiento de la colonia de *S. frugiperda*

En el laboratorio de Biotecnología Alimentaria y Vegetal de la Universidad de Guanajuato, ubicado en el Campus Irapuato-Salamanca, se mantuvo con éxito una colonia de *S. frugiperda*. Se logró mantener una población promedio mensual de 1,250 larvas de los diferentes instar, 350 adultos, 350 pupas y huevecillos.

9.2 Amplificación de *BackSpike* en larvas de *S. frugiperda*

Luego de inocular los viriones *BackSpike* en larvas sanas de *S. frugiperda*, se observó que algunas larvas murieron entre 5 y 6 días después de la infección, mientras que otras solo mostraron menor movilidad y cambios de color. Sin embargo, también se observó que algunas larvas continuaron su ciclo normalmente sin signos aparentes de infección y alcanzaron el estado de pupa (como se muestra en la Figura 9). Esto mismo se repitió en todas las veces que se inocularon larvas de *S. frugiperda* con viriones de *BackSpike*. El número de larvas inoculadas fue de 30, teniendo disponibles dos cajas con dieta artificial en cada amplificación. Todos los ejemplares que llegaron a la fase de pupa fueron desechados.

Para evitar el fenómeno común de canibalismo en las larvas de *S. frugiperda*, las larvas se individualizaban al colocar un separador con papel en la parte de la tapa de las cajas tan pronto llegaban al 3er estadio (Figura 9).

Fue posible distinguir, al microscopio óptico, hemocitos de *S. frugiperda* que tenían el núcleo hipertrofiado, presentando un volumen muy grande en comparación con el citoplasma y también fue posible distinguir el estroma virogénico, la membrana celular disgregada. No se encontraron cuerpos de oclusión en ninguna de las amplificaciones realizadas en las larvas de *S. frugiperda* (Figura 10).

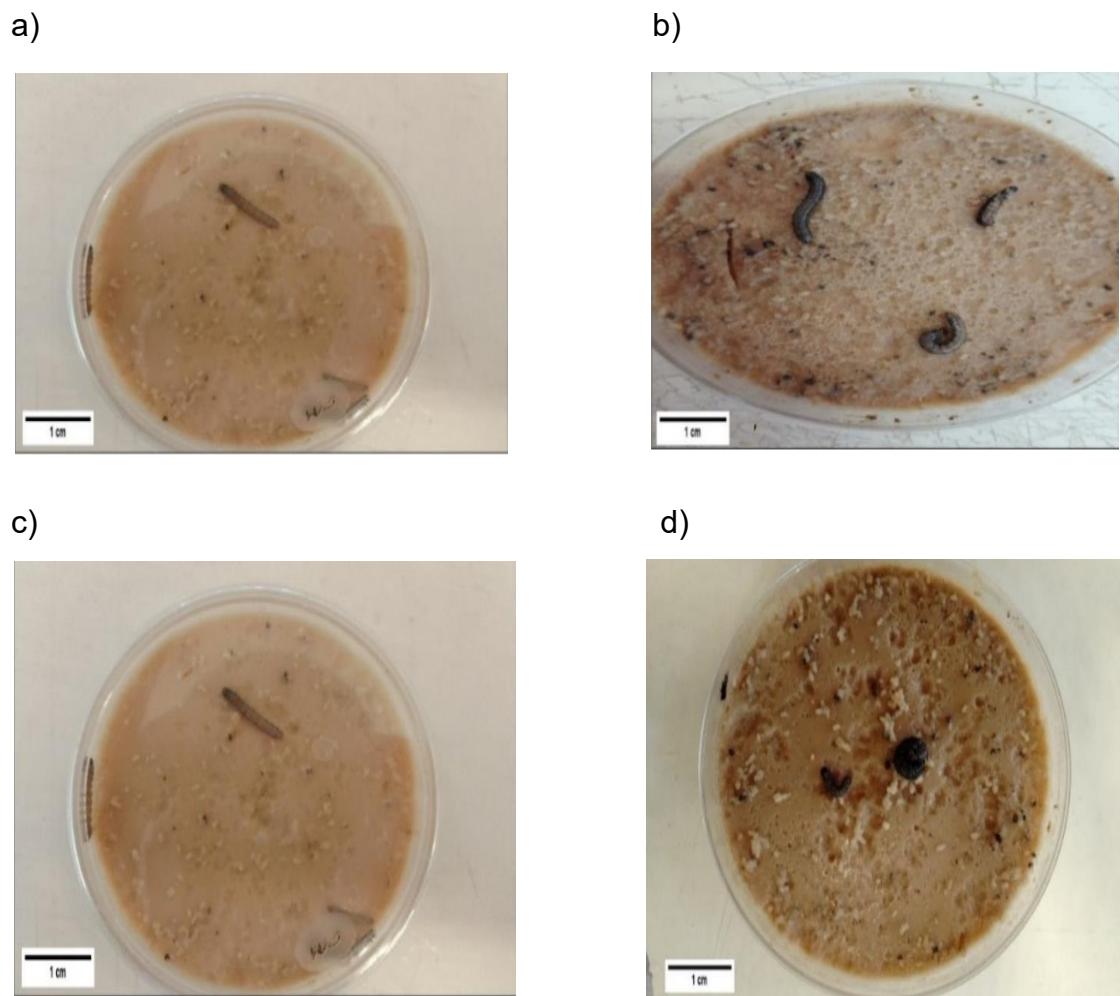


Figura 9. Larvas de *S. frugiperda* infectadas con el virus BackSpike. En comparación con larvas sanas no infectadas (a) y (c), las larvas infectadas (b) y (d) presentan alteraciones en la coloración corporal, junto con una marcada reducción o ausencia de respuesta a estímulos mecánicos y signos evidentes de letargo. Para evitar el canibalismo de las larvas de *S. frugiperda*, estas se colocan en cajas de Petri que contienen una celda para división.

Fue posible distinguir, al microscopio óptico, hemocitos de *S. frugiperda* que tenían el núcleo hipertrofiado, presentando un volumen muy grande en comparación con el citoplasma y también fue posible distinguir el estroma virogénico, la membrana celular disgregada. No se encontraron cuerpos de oclusión en ninguna de las amplificaciones realizadas en las larvas de *S. frugiperda* (Figura 10).

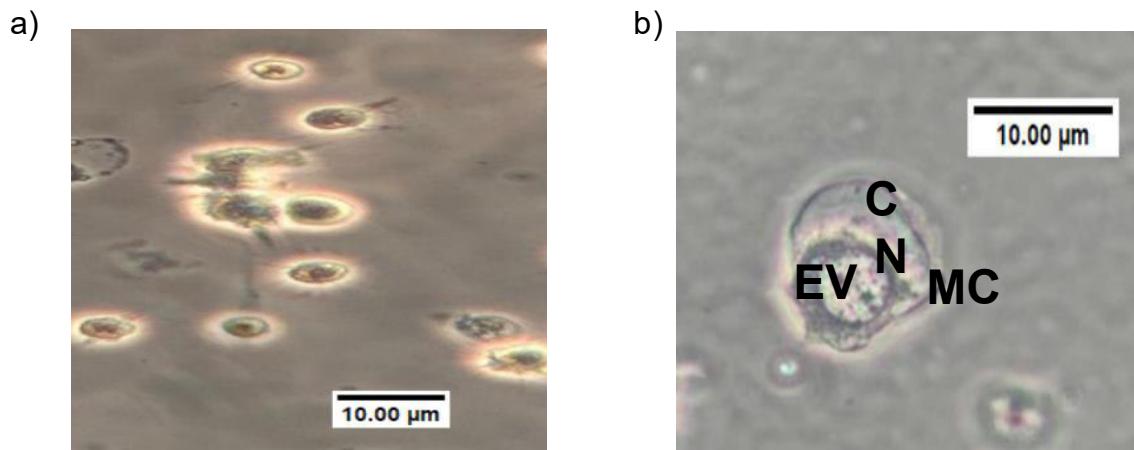


Figura 10. Hemocitos de larvas de *S. frugiperda* con y sin infección por el virus *BackSpike*. Se observó (a) una imagen de microscopía óptica en aumento 40X de hemocitos sanos, sin signos de infección por el baculovirus, que presentaron una membrana celular completa, la presencia del núcleo en posición central y ausencia de estroma virogénico. En el inciso (b) se observó una imagen de microscopía óptica en aumento 100X de hemocitos con signos de infección por baculovirus, pero sin la formación del Estroma virogénico 8EV), en el que el núcleo (N) prácticamente ha ocupado todo el lugar dentro del citoplasma (C).

En todas las amplificaciones de *BackSpike* en larvas de *S. frugiperda* fue posible observar hemocitos con la membrana celular atrofiada, discontinua, con un núcleo agrandado y ovalado, tal como se observa en la figura 13.

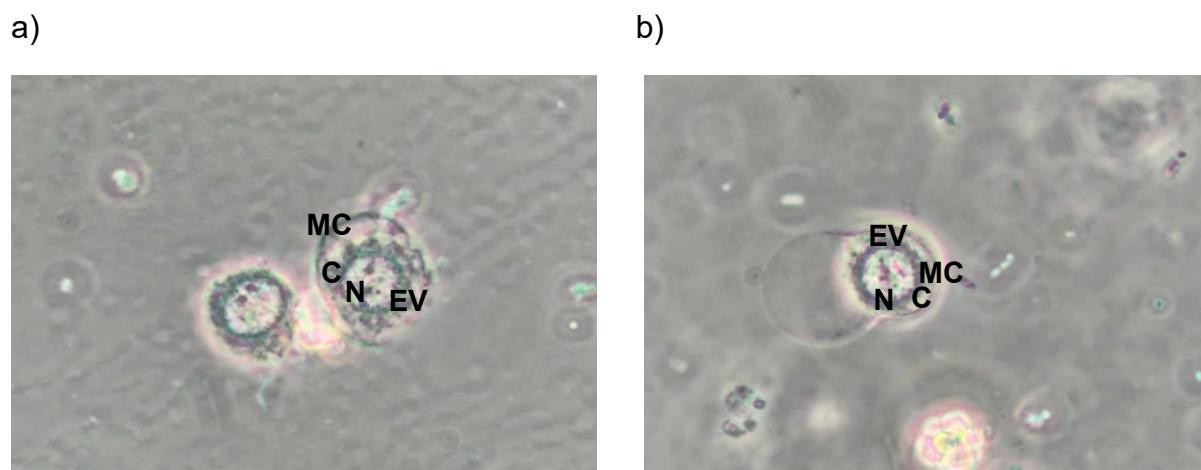


Figura 11. Hemocitos de *S. frugiperda* con signos de infección por baculovirus *BackSpike*. Imágenes de microscopía óptica en aumento 40X (a) y (b), que muestran la observación de los signos de infección por baculovirus en distintas amplificaciones, como lo son membrana celular (MC) atrofiada y discontinua, núcleo hipertrofiado y desplazado del centro (N) y presencia del estroma virogénico (EV). No se observó presencia de cuerpos de oclusión.

Además de las amplificaciones de *BackSpike* realizadas en las larvas completas de *S. frugiperda*, se precisó la inducción de la infección con *BackSpike* en frascos de línea celular de Sf9, tomando un vial de control negativo al cual no se le indujo infección, contando con 1×10^6 células, a su vez, se tomaron tres viales de células, cada uno de ellos con 1×10^6 células, los cuales fueron puestos en contacto con viriones de *BackSpike*. El monitoreo de los signos de infección se realizó cada 24 h durante 5 días (Figura 12).

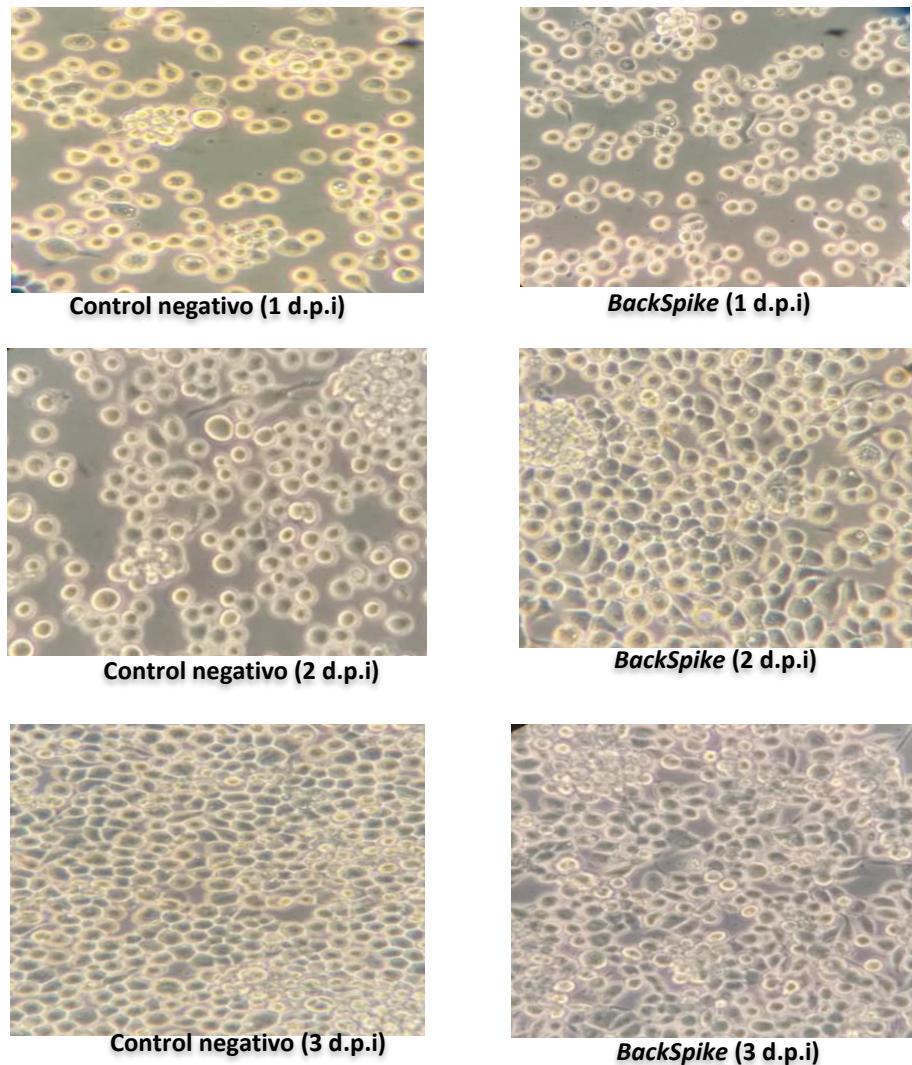


Figura 12. Infección de la línea celular Sf9 con viriones *BackSpike*. Se tomaron 1×10^6 células tanto para el control negativo como para las células a los cuales se les indujo la infección con *BackSpike*. Nunca se observaron signos de infección ni diferencias morfológicas de las células a las que se les coloco *BackSpike*, con respecto al grupo control. Por el contrario, cuanto mayor progresividad temporal, mayor confluencia de células lo que indica que la infección no se logró. Todas las observaciones se realizaron en microscopio invertido, usando el objetivo 40X.

9.3 Extracción de ADN de larvas

La extracción del ADN se realizó por el método de Fenol cloroformo alcohol isoamílico y se obtuvo ADN estable de hemocitos y de larva completa de *S. frugiperda* (Figura 13), estas muestras fueron seleccionadas para realizar la PCR y corroborar la presencia del gen de la proteína S y la dirección del inserto.

La purificación de ADN se realizó no únicamente una vez, sino después de cada una de las amplificaciones realizadas, seleccionando las larvas de *S. frugiperda* que presentaron signos de infección, tales como: hipertrofia nuclear, disgragación de la membrana celular y ausencia de cuerpos de oclusión; de dichas larvas también se utilizó la hemolinfa, la cual fue colocada en glutatió 0.1% en ADE o TE para extracción de ADN y se prepararon alícuotas, guardando los viriones en la solución de glutatió y separándolas del pellet celular por centrifugación. Dichos viriones se usaron para inducir infecciones posteriores en larvas sanas. también se tomaron alícuotas del sobrenadante de los viriones para realizar la extracción de ADN por el método anteriormente mencionado, esto con el fin de verificar la presencia de los viriones en el sobrenadante de centrifugación.

Cuando las larvas de *S. frugiperda* se encontraban muertas también se procedía a extraer ADN, sin embargo, la mayoría de las veces el ADN procedente de estas larvas se observaba degradado al realizar la visualización en gel de agarosa al 0.8%, y no fue posible hacer la PCR a partir del material genético colectado de las larvas muertas.

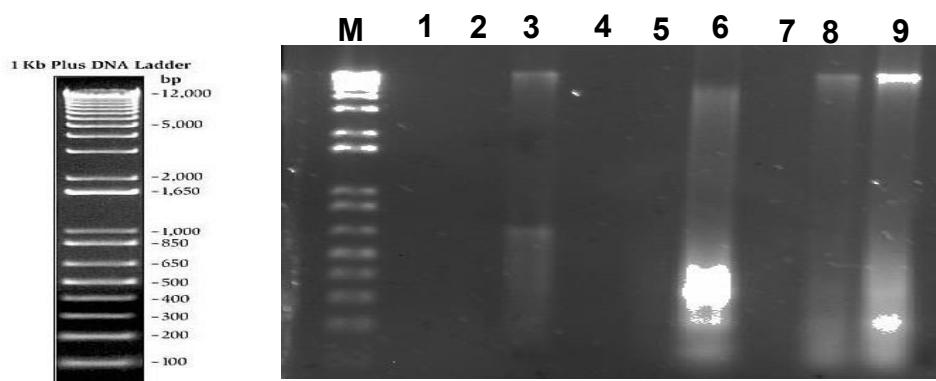


Figura 13. ADN extraído de larva completa y de hemocitos. En los carriles 1-5 se colocó ADN de larva completa. En el carril 3 es posible observar ADN. Por su parte, en los carriles 6-19 se observó ADN de hemocitos, se obtuvo ADN estable en los carriles 8 y 9. Las muestras con ADN se usaron para la PCR.

Se logró obtener ADN estable de hemocitos de larvas de *S. frugiperda* que presentaron signos de infección con el *BackSpike* en cada amplificación. No en todos los casos fue posible obtener ADN integro y de buena calidad, en la mayoría de los intentos se observaba degradado en los carriles (Figura 14).

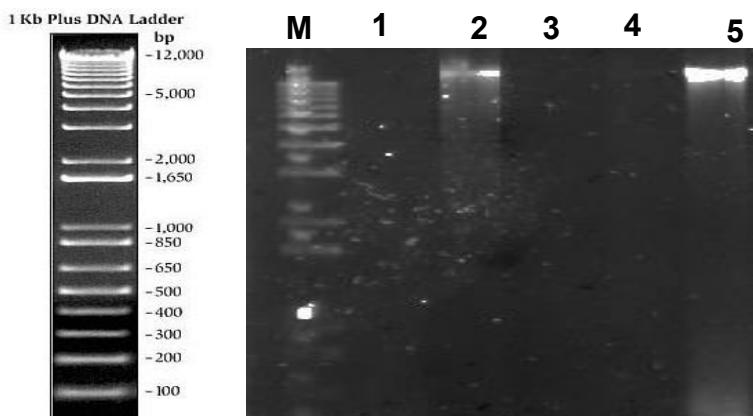


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de muestras de ADN extraído de hemocitos de *S. frugiperda* infectados con *BackSpike*. Se observó ADN de buen estado en los carriles 2 y 5.

9.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se logró la amplificación de un amplicón de 1,000 pb en muestras de ADN de larvas completas de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike*, que indicó la presencia del gen de la proteína Spike del SARS-CoV-2 (Figura 15).

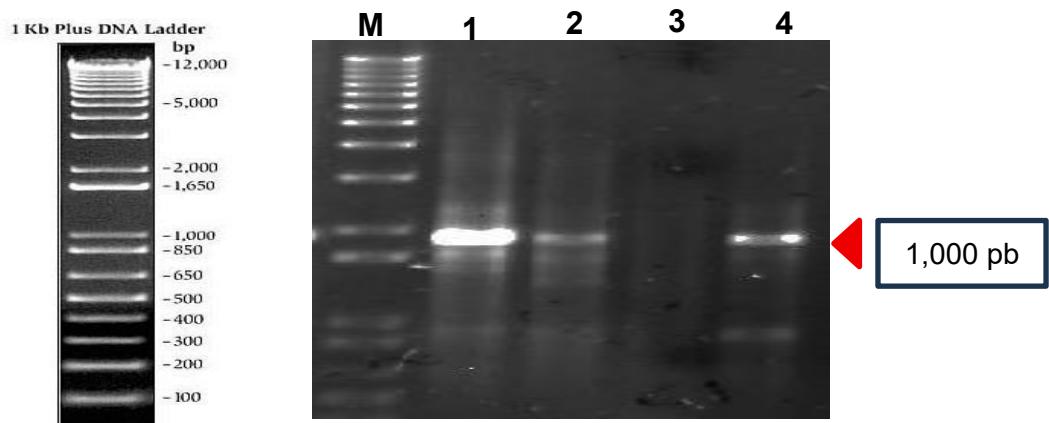


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% de la amplificación del fragmento del gen de la proteína S de SARS-CoV-2 en ADN de larvas de *S. frugiperda*. Se observó amplificación de un amplicón de 1,000 pb en el control positivo que es ADN de Bácrido con el gen de la proteína S de SARS-CoV-2. También se observa amplificación en los carriles 1 y 3, que corresponden a ADN de larvas completas de *S. frugiperda* infectada con *BackSpike*.

Se obtuvo la amplificación de 1,000 pb que indica la presencia del gen de la proteína S de SARS-CoV-2 en muestras de ADN de larvas completas y hemocitos de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike*, que indicó la presencia del gen de la proteína Spike del SARS-CoV-2 (Figura 16).

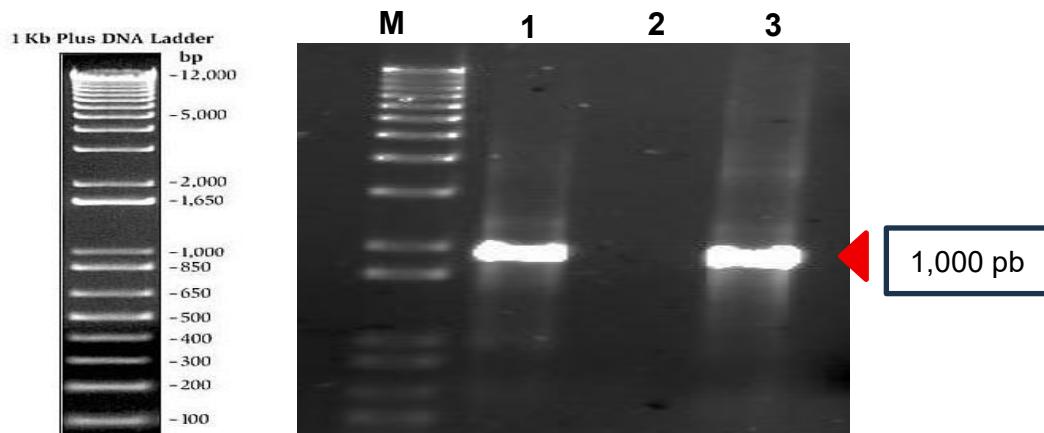


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% de la amplificación del fragmento del gen de la proteína S de SARS-CoV-2 en ADN de hemocitos de *S. frugiperda* infectados con *BackSpike*. M: marcador de peso molecular; carril 1: ADN del Bácmido con el gen de la proteína S de SARS-CoV-2; carril 1: ADN de larvas completas de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike*; carril 3: ADN de hemocitos de *S. frugiperda* infectados con *BackSpike*.

Se obtuvo la amplificación de un amplicon de 1,200 pb en muestras de ADN de hemocitos y de ADN de larvas completas de *S. frugiperda* infectados con *BackSpike*, que indicó la correcta dirección del inserto del gen de la proteína Spike del SARS-CoV-2 (Figura 17).

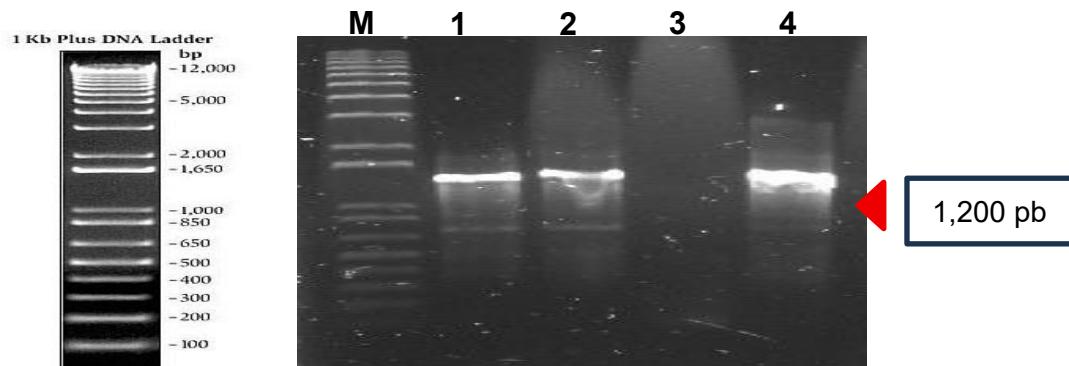


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% de la amplificación del fragmento de dirección del inserto del gen de la proteína S de SARS-CoV-2. M: marcador peso molecular; carril 1: ADN de Bácmido con el gen de la proteína S de SARS-CoV-2; Carriles 2 y 4: ADN de larva completa de *S. frugiperda* y ADN de hemocitos de *S. frugiperda*, respectivamente, ambos infectados con *BackSpike*.

9.5 Extracción de proteína de larvas de *S. frugiperda*

Se realizo extracción de proteína total de larvas de *S. frugiperda* con signos de infección por el virus *BackSpike* (Figura 18), por el método que se menciona en el protocolo. Se tomó un vial de esta muestra para realizar la identificación de proteínas por SDS-PAGE.

La cuantificación de proteína obtenida se realizó en un sistema Nanodrop lite spectrophotometer de Thermo Scientific, las concentraciones obtenidas fueron las siguientes:

1. Muestra de proteína total de larvas de *S. frugiperda* sin infectar con *BackSpike*: 52.1 mg/ml. **Control negativo**.
2. Muestra 1 de proteína total de larvas de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike*: 59.93 mg/ml.
3. Muestra 2 de proteína total de larvas de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike*: 25.4 mg/ml.
4. Muestra 3 de proteína total de larvas de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike*: 62.7 mg/ml.
5. Muestra 4 de proteína total de larvas de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike*: 62.25 mg/ml.
6. Muestra 5 de proteína total de larvas de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike*: 27.1 mg/ml.
7. Muestra 6 de proteína total de larvas de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike*: 61.7 mg/ml.
8. Muestra 7 de proteína total de larvas de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike*: 51.7 mg/ml.
9. Muestra 8 de proteína total de larvas de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike*: 23.8 mg/ml.
10. Muestra 9 de proteína total de larvas de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike*: 23.6 mg/ml.
11. Muestra 10 de proteína total de larvas de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike*: 25.2 mg/ml.

12. Muestra 11 de proteína total de larvas de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike*: 26.92 mg/ml.
13. Muestra 12 de proteína total de larvas de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike*: 89.93 mg/ml.
14. Muestra de proteína extraída de línea celular sf-9 co-transfектada con *BackSpike*: 23.6 mg/ml.

Todas las muestras de proteínas totales de larvas de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike* fueron obtenidas en diferentes experimentos de infección de larvas con *BackSpike*.

Todas las muestras de proteínas se diluyeron diluidas en una solución de Buffer de lisis (3M urea, 0.5% CHAPS, DDT 0.1 M).

9.6 Electroforesis de proteínas SDS-PAGE

Se realizaron geles de poliacrilamida SDS-PAGE, en los que se cargaron en todos los pozos 10 µl de las muestras de proteína total obtenida de larvas de *S. frugiperda* con signos de infección por *BackSpike*. Contrastando con el marcador de peso molecular BenchMark de Invitrogen. Todas las muestras de proteínas se diluyeron en una solución de PMBS, Buffer de lisis (3M urea, 0.5% CHAPS, DDT 0.1 M).

También se realizaron geles de poliacrilamida SDS-PAGE, en las que se cargaron 10 µl de la muestra de proteínas obtenidas de línea celular sf-9 co-transfectadas con *BackSpike*. Contrastando con el marcador de peso molecular BenchMark de ThermoFischer.

En el primer gel (Figura 18) se colocaron 25 mg de proteínas en los carriles 2-7 de muestra obtenida larvas de *S. frugiperda* con signos de infección por *BackSpike*; se observaron bandas de alrededor de 65-70 KDa en estos carriles, que corresponden a las bandas de la proteína S de SARS-CoV-2. En el carril 1 se colocó muestra de proteína de control negativo que era proteína total de larvas de *S. frugiperda* que no fueron infectadas con *BackSpike* y en el carril M se colocó marcador de peso molecular BenchMark.

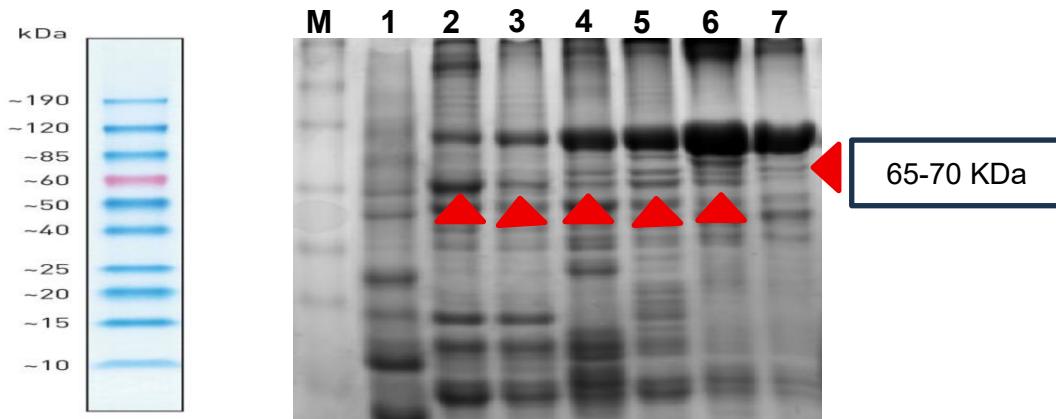


Figura 18. Gel de acrilamida al 12% SDS-PAGE, de proteína total extraída de larvas de *S. frugiperda* con signos de infección por *BackSpike*. En el carril M se colocó el marcador de peso molecular BenchMark; carril 1: control negativo que era proteína extraída de larvas de *S. frugiperda* sin infectar; carriles 2-7: proteína total extraída de larvas de *S. frugiperda* con signos de infección por *BackSpike*. Se observaron dos bandas de 65-70 KDa en las muestras de proteinas extraídas de larvas con signos de infección por *BackSpike* (carriles 2-7).

En el segundo gel (Figura 19), en el se colocaron 25 mg muestra de proteína control negativo que era proteína extraída de larvas de *S. frugiperda* sin infectar y se colocaron 25 mg proteína extraída de hemocitos de larva de *S. frugiperda* con signos de infección en los carriles restantes. En los carriles 2-7 se observaron bandas de 65-70 KDa correspondientes a las bandas de la proteína S de SARS-CoV-2.

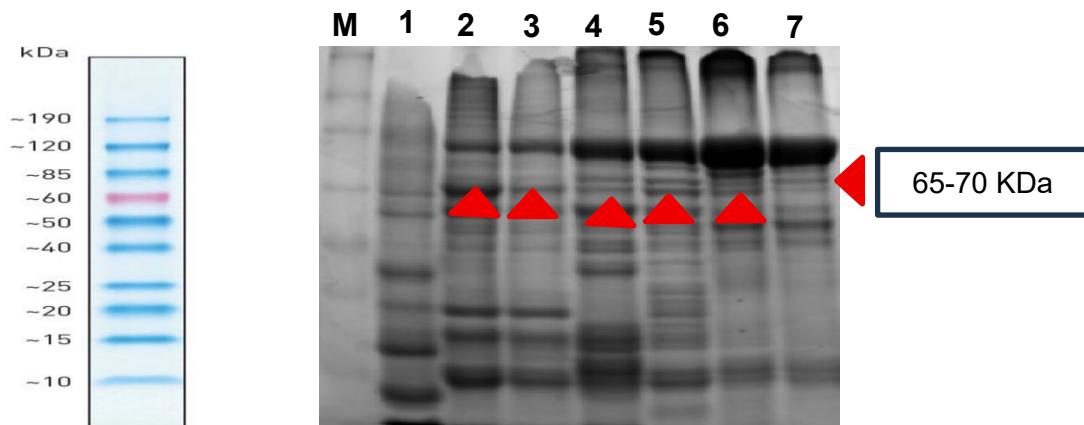


Figura 19. Gel de acrilamida al 12% SDS-PAGE, de proteína total extraída de larvas de *S. frugiperda* con signos de infección por *BackSpike*. Carril M: marcador de peso molecular Benchmark; carril 1: proteína de control negativo, que es proteína de larvas de *S. frugiperda* sin infectar; carriles 2-7: muestras de proteinas de larvas de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike*. Se observaron bandas de alrededor de 65-70 KDa en los carriles 5-7.

9.7 Obtención de suero pre inmune del ratón hembra de la cepa BALB/c

Se usó un ejemplar de ratón hembra de cepa BALB/c de 28 días de edad, el cual se alojó en jaula a una temperatura controlada de 22 °C (+/-3) con una humedad promedio entre 45 % y 70 %, sometido a ciclos de luz y oscuridad de 12 horas. Se le proporcionó acceso libre al agua y se les suministró alimento balanceado cada tercer día, en porciones de 5 gramos.

Se trajeron 1000 μ L de sangre de la vena central de la cola del ratón usado hembra de la cepa BALB/c, la cual se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos con el fin de separar el suero de los elementos formes de la sangre. Se obtuvieron 100 μ L de suero, los cuales fueron colocados en un tubo nuevo y estéril que se selló para evitar contaminación (Figura 20).

La muestra obtenida se guardó a -4°C hasta su posterior uso en el Ensayo de Inmuno Adsorción Ligado a Enzimas (ELISA).



Figura 20. Obtención de suero preinmune de ratón hembra de la cepa BALB/c. De la vena central de la cola del ratón hembra de la cepa BALB/C se obtuvieron 1000 μ L de sangre, la cual fue procesada para la obtención del suero preinmune por medio de centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos. La muestra de suero se guardó a -4 °C.

9.9 Laparotomía y análisis del bazo y las placas de Peyer del ratón hembra de la cepa BALB/c

El bazo del ejemplar murino presentó signos de esplenomegalia leve a moderada, debido a que presentó un tamaño longitudinal de 2.2 cm. Su volumen medido fue de 0.5 cm³, presentando una hepatomegalia leve (Figura 21).



Figura 21. Análisis del bazo del ejemplar murino de la cepa BALB/c. El bazo del ejemplar presentó un tamaño de 2.2 cm y un volumen de 0.5 cm³ y presentó signos de esplenomegalia leve a moderada.

Por su parte, las placas de Peyer del ratón y la porción del íleon se encontraron visiblemente abultadas, con una leve coloración blanquecina (Figura 22).



Figura 22. Análisis de las placas de Peyer del ejemplar murino de la cepa BALB/c. La porción del íleon del ratón, donde se localizan las placas de Peyer (señalado con flecha amarilla), se observó blanquecina y abultada.

9.10 Medición de las características nociceptivas

9.10.1 Evaluación del peso del ratón en función del curso de la inoculación con extracto de proteína de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike*

Según algunos estudios, como los de Zhang et al., 2020 y Guan et al., 2020, el peso corporal de los ratones cambia en los ejemplares que han contraído infección por SARS-CoV-2. Con este fin, se realizó la medición del peso corporal del ejemplar de

ratón hembra BALB/c en el día anterior a la primera inmunización (día 0), en el día de la inmunización, pero anterior a la misma (día 1) y en los días: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 15, 16, 18, 20, 22, 24, 26 y 28 días post inmunización. Los valores obtenidos del peso se presentan en la tabla 3, en ella se reportan los valores promedio de tres mediciones del peso del ejemplar murino en cada día en que se tomó el peso y se indican también los promedios del peso del ratón en cada día en que se registró la medición del peso. El valor inicial del peso fue de 35.0 g y durante los primeros cuatro días post infección con proteína S de SARS-CoV-2, el peso del ratón hembra de la cepa BALB/c se mantuvo constante (35 g) y a partir del día 10 se observó una tendencia ascendente, alcanzando un máximo de 37.0 g entre los días 14 y 22. En el día 16 se detectó una disminución transitoria del peso (hasta 35.2 g), seguida de una recuperación completa en los siguientes seis días (llegando a 37.0 g).

Tabla 3. Resultados de la medición del peso del ejemplar de ratón hembra de la cepa BALB/c en función de los días post inmunización con proteína extraída de larvas de *S. frugiperda* infectadas con BackSpike.

Días post inmunización	Peso (g)	
	Mediciones	Promedio
0	35	35.0
1	35	35.0
2	35, 36, 35	35.3
4	35, 35, 36	35.3
6	35, 35, 35	35.0
8	36, 35, 35	35.3
10	36, 36, 36	36.0
12	36, 36, 36	36.0
14	37, 37, 37	37.0
15	37, 37, 37.2	36.0
16	35.1, 35.3, 35.2	35.0
18	35.9, 36.1, 36.2	36.0
20	37, 37, 37	37.0
22	37.1, 37.0, 37.0	37.0
24	36.0, 36.1, 36.0	36.0
26	36.1, 36.0, 36.0	36.0
28	Sacrificio	Sacrificio

El análisis estadístico incluyó una regresión lineal para evaluar la relación entre el promedio del peso corporal del ejemplar de ratón y los días post inoculación del extracto de proteína asilada de larvas de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike*. La ecuación obtenida: $y = 0.0578x + 35.116$ mostró una pendiente positiva, lo que indica un aumento progresivo del peso corporal con el tiempo. El coeficiente de determinación ($R^2 = 0.4376$) reflejó una correlación moderadamente débil, aunque consistente, entre ambas variables. Durante los primeros cuatro días post infección el peso del animal se mantuvo constante (35 g) y después del día 6 se observó una tendencia al alza, alcanzando un peso máximo en el día 14 post infección. El descenso de peso posterior al día 15 post inoculación podría sugerir una recuperación del estado fisiológico normal del animal, a posteriori del contacto con la proteína (Figura 23).

En conjunto, estos resultados sugieren que la inmunización no generó efectos adversos evidentes sobre el estado fisiológico general del ejemplar, permitiendo una evolución estable del peso durante el periodo de estudio. (Figura 23), se tomaron los valores del promedio del peso del animal en función de los días post inoculación para construir la gráfica de regresión lineal.

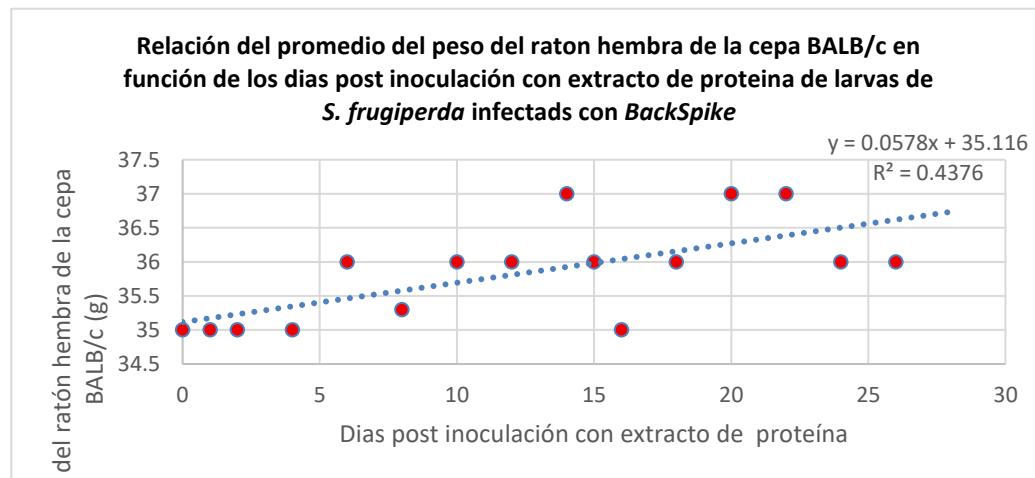


Figura 23. Gráfica de correlación lineal del promedio del peso del ratón hembra de la cepa BALB/c en función de los días post inoculación con proteína S de SARS-CoV-2. El valor de correlación $R^2= 0.4376$ indica que aproximadamente el 43.76 % de la variación del peso del ejemplar del ratón hembra de la cepa BALB/c se puede atribuir al paso de los días post infección. Los datos no están cerca del valor ideal $R^2=1$ de la pendiente de la función, indicando dispersión en la medición.

Se elaboró una gráfica de líneas de la relación del peso del ejemplar de ratón hembra de la cepa BALB/c en función de los días post inoculación con la proteína de larvas de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike*, en la cual se tomaron los valores del promedio del peso del ejemplar en función de los días post inoculación, para ver la tendencia del peso a lo largo de los días. Se observó de manera más explícita que durante los primeros cuatro días post infección el peso del animal se mantuvo constante (35 g) y después del día 10 se observó una tendencia al alza, alcanzando un peso máximo en el día 14 post infección con proteína S de SARS-CoV-2 (Figura 224).

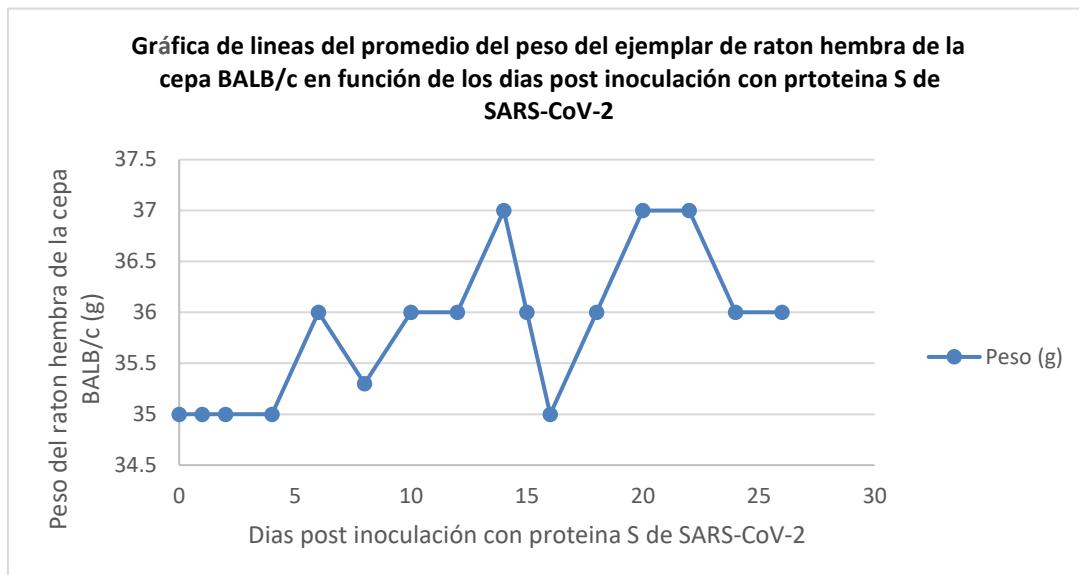


Figura 24. Gráfica de líneas de la relación del promedio del peso del ejemplar de ratón hembra de la cepa BALB/c en función de los días post inoculación con proteína S de SARS-CoV-2.
Durante los primeros cuatro días post inoculación el peso del animal se mantuvo constante (35 g) y después del día 10 se observó una tendencia al alza, alcanzando un peso máximo en el día 14 post infección. El descenso del peso en el ratón se observó posterior al día 15 post inoculación con proteína de larvas infectadas con *BackSpike*.

El valor obtenido de la prueba de correlación de Pearson de los datos del promedio del peso del ejemplar de ratón hembra de la cepa BALB/c en función de los días post inoculación con proteína S de SARS-CoV-2, fue de: 0.6615.

Una correlación fuerte, según el criterio de De la Vara Salazar en la tabla 2.

9.10.2 Evaluación de la temperatura del ejemplar de ratón hembra de la cepa BALB/c en función de los días post inmunización con proteína extraída de larvas de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike*

Según Carfi et al., 2020, la presencia de fiebre es el principal síntoma nociceptivo de la presencia de infección activa por SARS-CoV-2 en mamíferos. Se realizó la medición de la temperatura corporal del ejemplar murino en °C con un termómetro Koolmer infrarrojo digital en el día anterior a la primera inmunización con proteína S de SARS-CoV-2 (día 0), en el día de la inmunización con proteína S de SARS-CoV2, pero anterior a la inmunización (día 1) y en los días: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 15, 16, 18, 20, 22, 24, 26 y 28 post inmunización con proteína S de SARS-CoV-2.

Se observó un patrón de estabilidad de la temperatura corporal durante los primeros 10 días post inoculación con proteína S de SARS-CoV-2. La temperatura corporal mostró una elevación transitoria hasta 36.2 °C en el día 16. Entre los días 14 y 26 se documentaron episodios de hipotermia progresiva, con temperaturas descendiendo a 34.1 °C (día 24) y hasta 34.0 °C (día 26) (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados de la medición de la temperatura corporal del ejemplar de ratón hembra de la cepa BALB/c en función de los días post inmunización con proteína extraída de larvas de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike*.

Días post inmunización	Temperatura corporal	
	Mediciones	Promedio
0	35.4	35.4
1	35.4	35.5
2	35.3, 35.4, 35.3	35.3
4	35.3, 35.3, 35.2	35.2
6	35.6, 35.5, 35.5	35.5
8	35.5, 35.7, 34.6	35.2
10	35.7, 35.8, 35.8	35.8
12	35.4, 35.5, 35.5	35.5
14	35.1, 35.2, 35.3	35.2
15	34.1, 34.3, 34.1	34.1
16	35.7, 36.2, 36.2	36.2
18	36.1, 36.2, 36.2	36.1
20	35.5, 34.5, 34.5	34.5
22	34.6, 34.8, 34.6	34.6

24	34.1, 34.1, 34.1	34.1
26	34.0, 34.0, 34.1	34.0
28	Sacrificio	Sacrificio

Al analizar los datos de la gráfica de regresión lineal de los datos del promedio de la temperatura corporal del ejemplar murino en función de los días post inoculación con la proteína asilada de larvas de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike*, se observó una pendiente negativa: $y = -0.0426x + 35.665$, lo que indica una tendencia decreciente moderada de la temperatura a lo largo del tiempo. El coeficiente de determinación ($R^2 = 0.1371$) refleja una correlación débil, los datos no están cerca del valor ideal $R^2=1$ de la pendiente de la función, indicando dispersión en la medición.

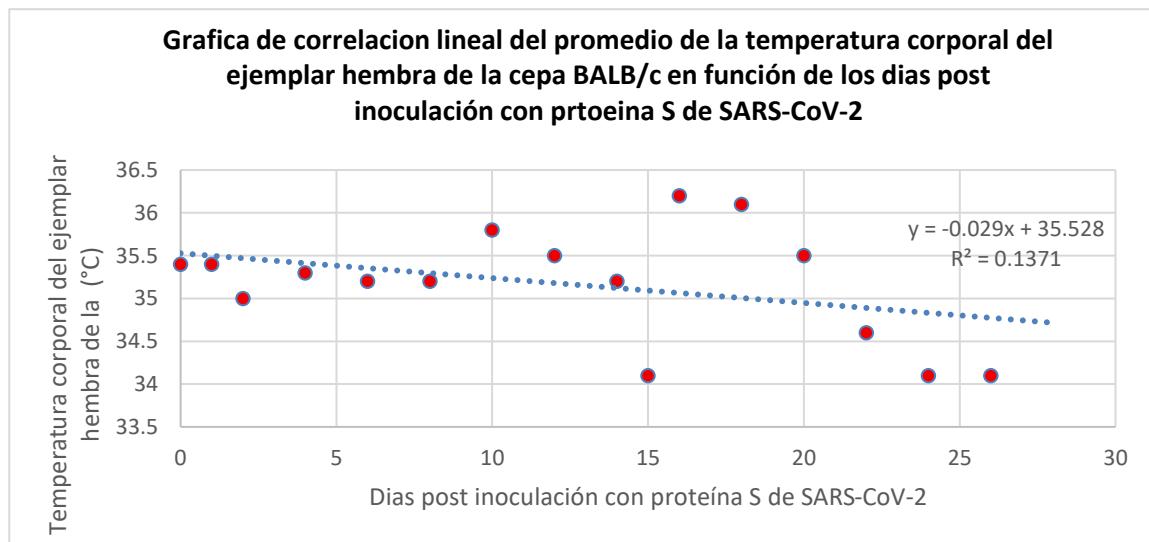


Figura 25. Gráfica de correlación lineal de la temperatura corporal en función de los días post inoculación. El coeficiente de terminación bajo ($R^2= 0.1713$) explica que solamente alrededor del 17.13 % de la variación de la temperatura corporal del ejemplar murino se explica por relación con el paso del tiempo en los días post inoculación con la proteína.

Para visualizar la evolución térmica se elaboró una gráfica de líneas de la relación del promedio de la temperatura corporal del ratón hembra de la cepa BALB/c en función de los días post inoculación con proteína extraída de larvas de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike*. Se observó que la temperatura del ejemplar de ratón se mantuvo casi constante a lo largo de los días 0-6 post inmunización, seguida de un

incremento moderado hasta 35.8 °C en el día 10; posteriormente, seguida de un rebote de temperatura hasta 36.2 °C en el día 16, y finalmente se observó una caída abrupta a 34.0 °C en el día 26 post inmunización con proteína S de SARS-CoV-2 (Figura 26).

No se observó una tendencia sostenida de aumento de temperatura (fiebre), pero se observaron dos picos de temperatura en los días 16 y 18, cuyas temperaturas registradas fueron de 36.2 °C y 36.1 °C, respectivamente

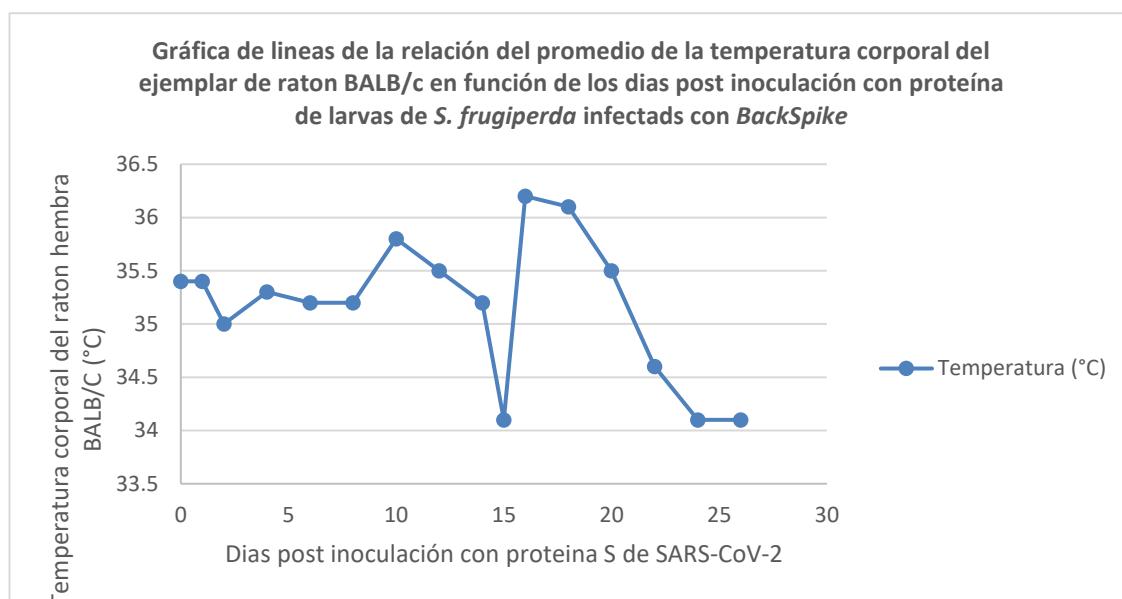


Figura 26. Gráfica de líneas de la relación del promedio de la temperatura corporal del ejemplar de ratón hembra BALB/c en función de los días post inoculación con proteína S de SARS-CoV2.
La temperatura del ejemplar se mantuvo casi constante a lo largo del experimento, teniendo un descenso brusco a partir del día 15 post infección, pero que no se mantuvo en días posteriores. No se observa una tendencia al aumento de temperatura (fiebre).

El valor obtenido de la prueba de correlación de Pearson de la relación del promedio de la temperatura corporal del ejemplar de ratón hembra BALB/c en función de los días post inoculación con proteína S de SARS-CoV-2, fue de: -0.370.

Una correlación moderada según el criterio de De La Vara Salazar en la tabla 2.

A medida que aumentan los días post inoculación, la temperatura tienden a disminuir muy ligeramente. Relación entre las dos variables moderada.

9.10.3 Evaluación de la irritabilidad del ejemplar de ratón hembra de la cepa BALB/c en función del curso de la inoculación con proteína de larvas de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike*

Según Carfi et al., 2020, la incapacidad de hacer tareas motoras o esfuerzo físico y que se ven reflejadas en poca reactividad a estímulos mecánicos (baja irritabilidad física, provocada por dolor muscular) es el segundo síntoma nociceptivo de la presencia de infección activa por SARS-CoV-2 en modelos murinos. Se realizó una prueba de la medición de la respuesta a estímulos mecánicos, que consistió en tocar la parte trasera de la cola del ejemplar y observar si el acro reflejo es rápido, lento o inexistente. Las pruebas fueron realizadas el día anterior a la primera inmunización (día 0), en el día de la inmunización, pero anterior a la misma (día 1) y en los días: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 24, 26 y 28 días post inmunización.

Durante los primeros cuatro días post inmunización con la proteína, la respuesta a estímulos mecánicos del ejemplar se observó como muy alta. A partir de los 6 post inoculación y hasta el día 22 post inoculación, la irritabilidad del ejemplar murino se observó como alta. Finalmente, en el día 24 la irritabilidad se vió baja y en el día 26 la irritabilidad se vió alta (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados de la medición de la respuesta a estímulos mecánicos del ejemplar murino de la cepa BALB/c en función de los días post inoculación con proteínas de larvas de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike*.

Días post inmunización	Irritabilidad (respuesta a estímulos mecánicos)
0	++++ Muy alta
1	++++ Muy alta
2	++++ Muy alta
4	++++ Muy alta
6	+++ Alta
8	+++ Alta
10	+++ Alta
12	+++ Alta
14	+++ Alta
15	+++ Alta
16	+++ Alta

18	+++	Alta
20	+++	Alta
22	+++	Alta
24	++	Baja
26	+++	Alta
28	Sacrificio	

9.10.4 Evaluación del tiempo de reflejo pupilar del ejemplar hembra de ratón de la cepa BALB/c en función de los días post inmunización con proteína de larvas de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike*

Para medir la dilatación pupilar el tiempo de reflejo se realizaron mediadas colocando luz banca directamente en los ojos del ejemplar y registrando el tiempo en el que la pupila se contrae por la presencia de luz.

Las pruebas fueron realizadas el día anterior a la primera inmunización (día 0), en el día de la inmunización, pero anterior a la misma (día 1) y en los días: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 15, 16, 18, 20, 22, 24, 26 y 28 días post inmunización.

Los resultados del tiempo de reflejo pupilar del ejemplar de ratón hembra de cepa BALB/c en función de los días post inmunización con proteína S de SARS-CoV-2 se muestran en la tabla 6, en ella se indicaron tres mediciones promedio del tiempo de reflejo pupilar del ratón en su día indicado y se indicó el promedio de la medición cada vez en que se tomó el tiempo de reflejo pupilar.

Tabla 6. Resultados de la medición del reflejo pupilar del ejemplar de murino de cepa BALB/c en función de los días post inoculación.

Días post inmunización	Tiempo de reflejo pupilar (s)	
	Mediciones	Promedio
0	3, 5, 4	4.0
1	3, 4, 5	4.0
2	3, 4, 4	3.6
4	3, 4, 4	3.6
6	3, 4, 4	3.6

8	4, 4, 4	4.0
10	3, 3, 3	3.0
12	3, 3, 3	3.0
14	3, 3, 3	3.0
15	3, 3, 3	3.0
16	4, 4, 4	4.0
18	3, 3, 3	3.0
20	4, 4, 4	4.0
22	5, 5, 5	5
24	5, 4, 5	5
26	5, 5, 6	5
28	Sacrificio	Sacrificio

Para realizar la gráfica de correlación lineal del tiempo de reflejo pupilar del ratón hembra de la cepa BALB/c en función de los días post inoculación con proteína S de SARS-CoV-2, se tomaron los valores del promedio del tiempo de reflejo pupilar en función de los días post inoculación. Se obtuvo una gráfica de pendiente positiva que indica una correlación directa entre el promedio del tiempo de reflejo pupilar del ejemplar murino y los días post inoculación. Se observó un valor de correlación $R^2=0.1733$ (Figura 27).

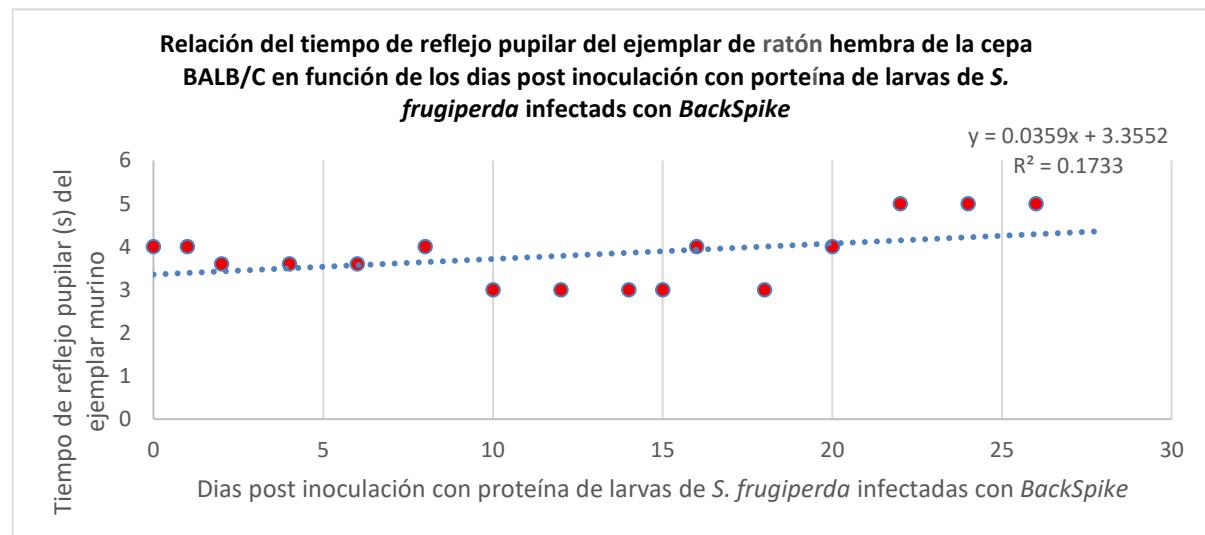


Figura 27. Gráfica de correlación lineal del tiempo de reflejo pupilar del ejemplar de ratón hembra de la cepa BALB/c en función de los días post inoculación con proteína de larvas infectadas con *BackSpike*. El coeficiente de terminación bajo ($R^2= 0.1733$) explica que alrededor del 17.33 % de la variación del reflejo pupilar se explica por relación con el paso del tiempo.

Al elaborar la gráfica de líneas de la relación del tiempo de reflejo pupilar del ratón hembra de la cepa BALB/c en función de los días post inoculación con proteína extraída de larvas de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike*, se tomaron los valores del promedio del tiempo de reflejo pupilar del ejemplar en función de los días post inoculación, y se observó una disminución progresiva del tiempo de reflejo pupilar entre los días 2 y 5 post inmunización con proteína la proteína; pero después del día 10 post infección se observa una disminución hacia los 3 segundos (manteniéndose repetidos los resultados los días 10, 12, 14 y 15 post infección) y habiendo un aumento sostenido del tiempos de reflejo pupilar desde el día 16 y hasta el día 22 post inoculación, y manteniéndose así hasta el día 26 post inoculación con proteína S de SARS-CoV-2 (Figura 28).

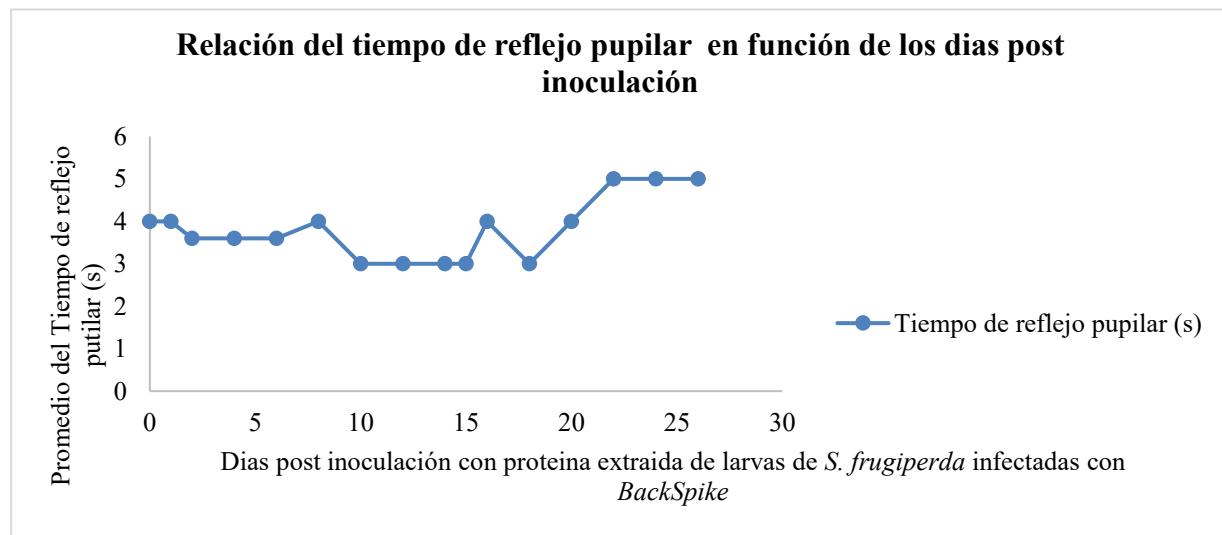


Figura 28. Gráfica de líneas de la relación del promedio del tiempo de reflejo pupilar en función de los días post inoculación con proteína S de SARS-CoV-2.

El valor obtenido de la prueba de correlación de Pearson para la relación del promedio del tiempo de reflejo pupilar del ratón en función de los días post inoculación con proteína de extraída de larvas de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike*, fue de: 0.416.

Correlación moderada. Hay una interacción moderada entre el reflejo pupilar y los días post infección y el tiempo de reflejo pupilar tiende a aumentar.

9.10.5 Ensayo de Inmuno Adsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

Se compararon las absorbancias del suero preinmune del ratón hembra de la cepa BALB/c y el suero inmune del mismo ejemplar, a diferentes tiempos de incubación con solución de revelado: 5, 10, 15 y 30 minutos de incubación. Los resultados de la prueba de ELISA arrojan que la proteína inoculada si presentó una respuesta inmune secundaria, mediante la producción de anticuerpos en ratón. La lectura del suero inmune de ratón usada para elaborar las gráficas mostradas y la Tabla 7, es la que corresponde al suero inmune 2 en la Figura 29.

Al realizar la observación del revelado de la placa de 96 pozos, se observó un cambio uniforme de color en los pozos correspondientes al suero preinmune del ejemplar de ratón hembra de la cepa BALB/c, mientras que en los pozos en los que se colocó el suero inmune del mismo ejemplar el color es más intenso en cuanto mayor es la concentración de la dilución colocada, y menos intenso conforme menor es la concentración de la dilución colocada (Figura 29). La observación evidente del cambio de coloración se observó pasada media hora de incubación con la solución de revelado, mientras que no se observó cambio en la coloración a los 5 y 10 minutos de incubación.

Las lecturas de absorbancias por su parte indican que la absorbancia es mayor en las diluciones más concentradas, y es menor conforme disminuye la concentración de la dilución (Tabla 7). A los 5 minutos la absorbancia es menor, y aumenta conforme avanza el tiempo: 10 y 30 minutos (Figura 29).

Se observó un incremento progresivo en la absorbancia del suero inmune 2 en comparación con el suero preinmune a lo largo de los tiempos de incubación evaluados (5, 10, 15 y 30 minutos). El suero inmune 2 presenta valores mayores que el suero preinmune en todas las diluciones desde 1:100 hasta 1:900, particularmente a los 30 minutos de incubación, donde se registra la absorbancia máxima (1.052 en la dilución 1:100) (Tabla 7).

A partir de la dilución 1:900, la absorbancia del suero inmune del ratón hembra de la cepa BALB/c comienza a aproximarse a los valores del suero preinmune del mismo

ejemplar en todos los tiempos en los que se midió la absorbancia (5, 10, 15 y 30 minutos de incubación con solución de revelado), lo que sugiere que esa es la última dilución con señal específica detectable (Figura 30 y Tabla 7), o el título de anticuerpos.

En contraste, el suero preinmune muestra absorbancias estables en todos los tiempos y diluciones (entre 0.461 y 0.502), lo que confirma la ausencia de anticuerpos específicos previos a la inmunización (Figura 30 y Tabla 7).

Los pozos con PBS y suero preinmune mostraron absorbancias bajas y constantes en todos los tiempos, lo que evidencia ausencia de reactividad cruzada (Figura 30).

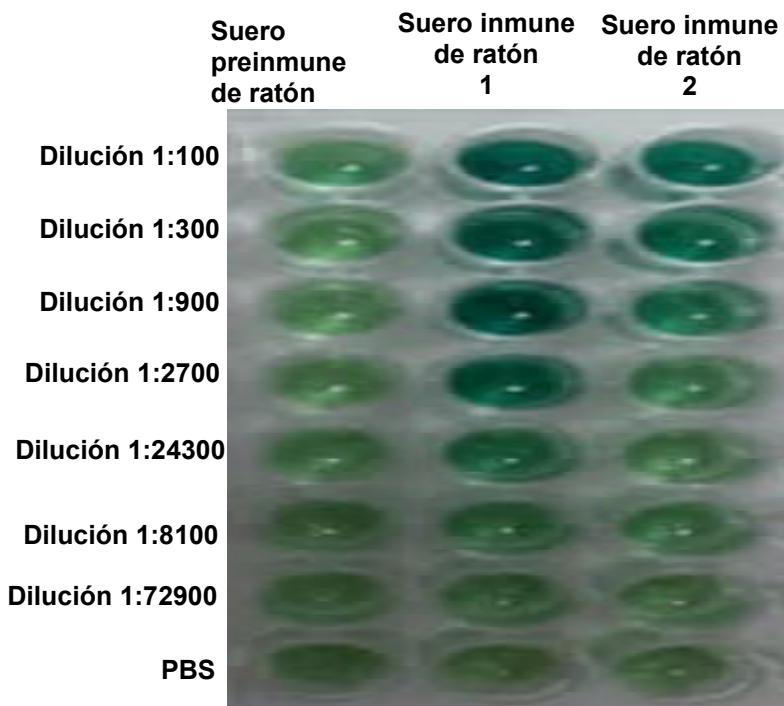


Figura 29. Placa de ELISA con suero preinmune de ratón hembra de la cepa BALB/c y suero inmune del mismo ejemplar a los 30 minutos de incubación con solución de revelado. En las diluciones del suero preinmune de ratón hembra de la cepa BALB/c se observa un color uniforme y no se aprecia reacción del colorante ABTS con anticuerpos. En la primera lectura del suero inmune del ratón hembra de la cepa BALB/c la intensidad de color desciende conforme desciende la concentración de la dilución usada del suero inmune, lo mismo ocurre para la segunda lectura del suero inmune.

Tabla 7. Absorbancias del suero preinmune de ratón hembra de la cepa BALB/c y el suero inmune 2 del mismo ejemplar a 5, 10, 15 y 30 minutos de incubación.

Diluciones	5 minutos de incubación		10 minutos de incubación		15 minutos de incubación		30 minutos de incubación	
	Suero inmune 2	Suero preinmune	Suero Inmune 2	Suero preinmune	Suero inmune 2	Suero preinmune	Suero inmune 2	Suero preinmune
1/100	0.555	0.485	0.58	0.492	0.633	0.502	1.052	0.585
1/300	0.541	0.487	0.549	0.485	0.583	0.487	0.816	0.5
1/900	0.506	0.486	0.508	0.484	0.527	0.486	0.674	0.499
1/2700	0.484	0.479	0.484	0.477	0.491	0.477	0.536	0.475
1/8100	0.483	0.479	0.483	0.478	0.484	0.479	0.493	0.48
1/24300	0.485	0.485	0.487	0.482	0.49	0.481	0.524	0.477
1/72900	0.479	0.481	0.478	0.477	0.478	0.477	0.478	0.483
PBS	0.488	0.489	0.485	0.485	0.485	0.483	0.48	0.461

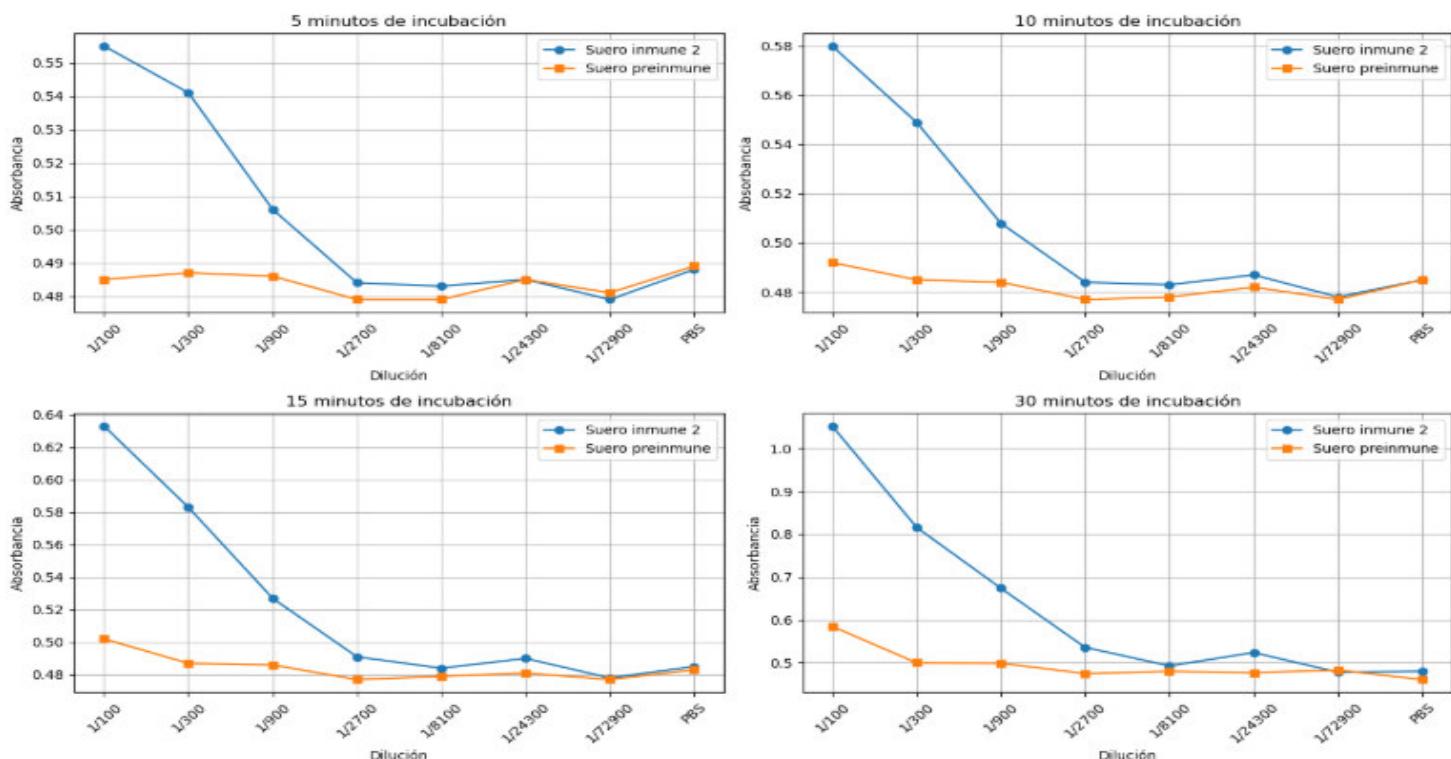


Figura 30. Curvas de absorbancia del ELISA indirecto para detección de anticuerpos contra la proteína S del SARS-CoV-2 en suero de ratón BALB/c, antes (preinmune) y después (suero inmune 2) de la inmunización, evaluadas a diferentes tiempos de incubación. Curvas de absorbancia obtenidas a 5, 10, 15 y 30 minutos de incubación en ensayo ELISA indirecto, comparando la absorbancia de las diluciones de los suero preinmune (línea naranja) y suero inmune 2 (línea azul).

Al comparar las curvas de absorbancia del suero preinmune del ratón hembra de la cepa BALB/c con las del suero inmune, se observó que las primeras presentan valores bajos y prácticamente constantes a lo largo del tiempo de incubación, sin un incremento significativo, mientras que las curvas del suero inmune del ratón hembra de la cepa BALB/c muestran un aumento progresivo de la absorbancia con el tiempo, especialmente en las diluciones más concentradas (1/100 y 1/300), lo que evidencia una diferencia clara en la capacidad de unión específica del suero inmune frente al preinmune, siendo este último un control negativo que confirma la especificidad de la respuesta observada (Figura 31).

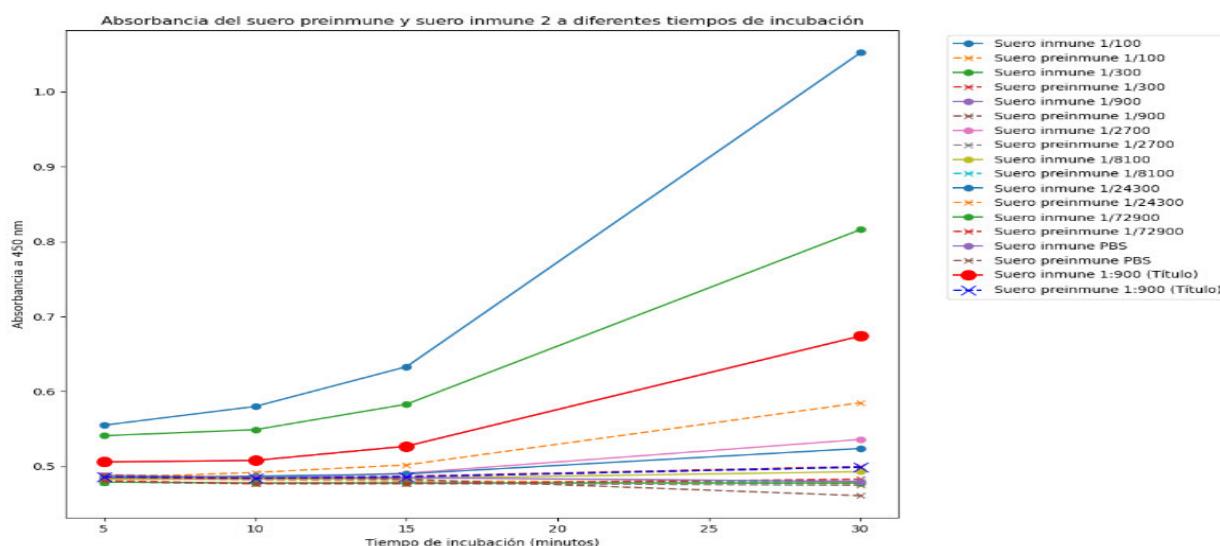


Figura 31. Gráfica comparativa de la absorbancia del suero preinmune y el suero inmune a diferentes tiempos de incubación (5, 10, 15 y 30 minutos) resaltando la comparación con la dilución 1:900, como el título de anticuerpos. La dilución 1:900 es el título de anticuerpos, definido como la mayor dilución en la que la señal del suero inmune se mantiene por encima del suero preinmune y del fondo. Esto indica que, a esa dilución, el suero inmune contiene una cantidad suficiente de anticuerpos contra la proteína inoculada.

Cuando se realizó el análisis del comportamiento del suero inmune del ejemplar murino de cepa BALB/c a lo largo del tiempo de incubación con la solución de revelado, se observó una cinética de unión antígeno-anticuerpo progresiva y específica. A los 5 minutos, la curva arrojó una absorbancia moderada que disminuye con la dilución, lo que indica una unión inicial aún en incipiente desarrollo. A los 10 y

15 minutos, se observó un incremento sostenido en la absorbancia, especialmente en las diluciones más concentradas (1:100 a 1:900).

El resultado más evidentemente diferenciable se presenta a los 30 minutos, donde la curva alcanza su máximo de absorbancia en todas las diluciones que se realizaron, con una diferencia notable respecto a los otros tiempos medidos de incubación son solución de revelación. Este comportamiento indica que a los 30 minutos se potencia una interacción más completa y más estable entre los anticuerpos del ratón y el antígeno (Figura 32).

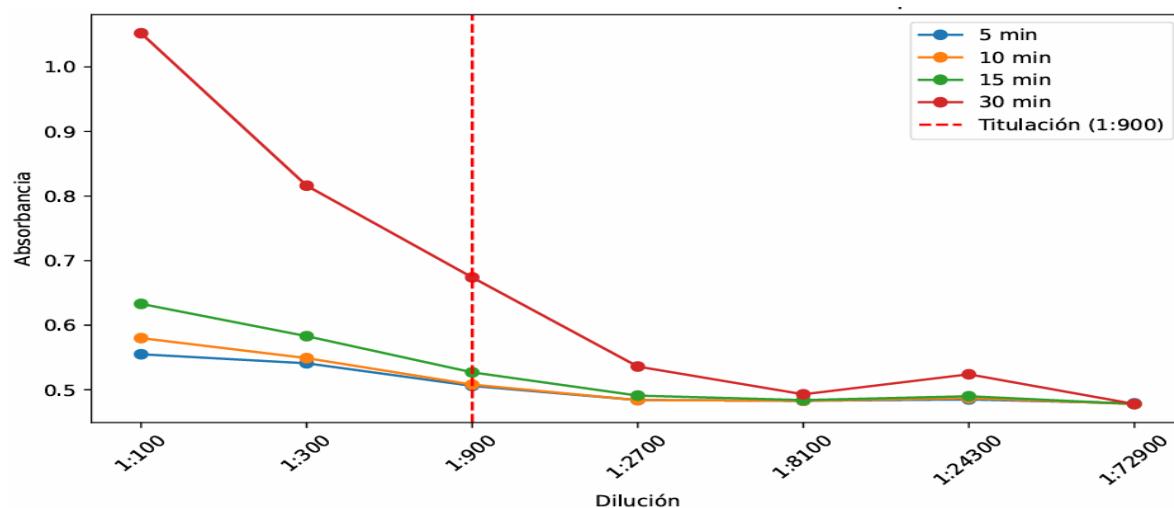


Figura 32. Gráfica de la absorbancia del suero inmune 2 obtenido del ratón hembra BALB/c en diferentes tiempos de incubación con solución de revelado. Las curvas se separan más claramente en diluciones bajas (1:100, 1:300 y 1:900), y la absorbancia máxima se alcanza a los 30 minutos de incubación.

X. Discusión

En este trabajo fue posible obtener la caracterización a nivel molecular del baculovirus recombinante *BackSpike* que expresa la proteína S de SARS-CoV-2. Se logró detectar la presencia del fragmento del gen de la proteína S, cuyo tamaño esperado se corroboró con los antecedentes directos (Rangel Núñez, 2021) y es de 1,000 Pb, así como la dirección del inserto, que es de 1,200 Pb, haciendo uso de la técnica de la PCR y utilizando oligonucleótidos específicos diseñados para la amplificación de dicha secuencia; sin embargo, a pesar de que en varias ocasiones el ADN muestra extraído de larvas con signos de infección o de hemocitos con signos de infección era estable al realizar sus visualización mediante electroforesis en gel de agarosa, y la cantidad de ADN era generalmente superior a la necesaria para realizar PCR, que es de 100 ng (Kramer, 2001), y los criterios de pureza del ADN extraído también se cumplían de manera satisfactoria, siendo las relaciones de absorbancia obtenidas 1.8-2.2 (Fialova et al., 2020) en la mayoría de las ocasiones fue imposible realizar la amplificación para la detección de la presencia del gen al igual que la detección de la dirección del inserto. Ambas amplificaciones se lograron realizar una sola vez en larva total y una sola vez en hemocitos infectados y una sola vez en sobrenadante, en todo el tiempo que se llevaron a cabo amplificaciones en el presente estudio. Si bien las amplificaciones obtenidas se lograron haciendo uso de las condiciones originales de la PCR, se intentó cambiar la astringencia como una solución fáctica posible para tratar de hacer eficiente la PCR en las muestras obtenidas de ADN para las amplificaciones correspondientes (Balasubramian et al., 2012), no obstante, no se obtuvieron amplificaciones del gen ni de la dirección del inserto al modificar la astringencia de la PCR.

Los mecanismos moleculares involucrados en la recombinación de tipo homóloga en el sistema Bac to Bac dependen de la actividad de enzimas que permitan la recombinación, y dichas enzimas deben reconocer dos sitios T7nR y T7nL, para que se dé la recombinación con precisión y con alto grado de eficiencia (Volkmann, 1995). Si estas enzimas no funcionan de manera adecuada, esto podría provocar la inserción inadecuada o parcial del gen de la proteína S en el Bácmido, lo que

llevaría, en sí mismo, a que no se expresara correctamente el gen y, consecuentemente, la prácticamente nula producción de la proteína S, esto podría ser una explicación, como juicio sintético a priori, del porque en el trabajo de antecedentes directos el porcentaje de recombinación es muy bajo (Rangel Núñez, 2021). La recombinación eficiente requiere que el gen exógeno sea adecuadamente insertado en el genoma viral (Sánchez, 2005). Es factible que esta sea una de las razones por las cuales, en la práctica, ninguna de las poblaciones de viriones generadas fue útil para inducir infección en línea celular Sf9.

Otra posible explicación del por qué la amplificación solo ocurrió una vez por muestra, tiene que ver con el proceso de ensamblaje del virión (Harrison et al., 1996). Alteraciones en la expresión o la interacción de proteinas estructurales del virión (así como también un solapamiento de marcos de lectura, ORF) con la proteína S, sea por interacción alostérica o por interacciones físicas, podría resultar en la producción de viriones defectuosos o en la alteración y baja producción de viriones funcionales (Mothes et al., 2019), esta idea es especialmente propuesta debido a que el gen de la poliedrina que se escindió es un gen estructural, que si bien no está involucrado en el proceso de infección, su ausencia si puede estar relacionada con la estabilidad estructural y en la capacidad de los viriones de interactuar con la célula (Ma & Che, 2004). Un virión defectuoso podría no haber sido capaz de infectar las células de las larvas ni las células de la línea Sf9 o, en su defecto, generar niveles mínimos de infección (lo que corresponde con la evidencia experimental encontrada en los hemocitos: que la gran mayoría de ellos no presentaba signos de infección ni siquiera a las 72 h post infección).

También es cierto que otra posible explicación radica no en la funcionalidad per se del sistema, o no en las características inherentes del funcionamiento metodológico del proceso molecular de recombinación y de generación de viriones funcionales, sino que, por el contrario, la explicación podría ser propia de la larva y su sistema de defensa inmunitario. En algunos casos, los insectos pueden llegar a desarrollar respuestas de defensa que pueden interferir con la expresión de genes de interés, y aunque los insectos tienen un sistema inmunitario rudimentario, la respuesta de

interferón puede estar involucrada en el aborto de la expresión del gen de la proteína S (Asgari et al., 2018).

El primer objetivo específico, amplificar el baculovirus recombinante *BackSpike* en insectos vivos de *S. frugiperda*, determinar la expresión del gen S y la dirección del inserto para la generación de la proteína S, se cumplió de manera satisfactoria. Sin embargo, tal como se menciona al inicio de esta sección de discusión, la mayoría de las veces que se indujo la infección a las larvas estas presentaban signos de infección por baculovirus, exceptuando la presencia de cuerpos de oclusión en su observación microscópica, característica exigida por el diseño del sistema (Rangel Núñez, 2021) y que es una expresión del hecho mismo de haber escindido el gen de la poliedrina (gen que genera la producción de poliedrina, la cual a su vez, genera los cuerpos de oclusión en *AcMNPV*), esto mismo conlleva a concluir que la infección de las larvas por el virus recombinante, *BackSpike* se genera, puesto que en ninguna de las repeticiones de la inducción de infección se logró la observación de cuerpos de oclusión, pero si las características de infección por baculovirus: membrana celular disgregada, núcleo hiperatrofiado y grande y presencia del estroma virogénico (Feng et al, 2021). La infección no se puede atribuir a un virus silvestre de *AcMNPV*, debido a que no se ha encontrado la presencia de cuerpos de oclusión en los hemocitos observados a microscopia, la infección es atribuible al virus recombinante *BackSpike*, que, al no tener el gen de la poliedrina, genera una infección con toda sintomatología, pero sin la presencia de cuerpos de oclusión.

Cuando se realizó la extracción de hemolinfa de las larvas con signos de infección, y se corroboraron las características de infección antes mencionadas en los hemocitos por medio de observaciones microscópicas, y se procedió a la obtención de los viriones brotados, en cada ocasión se logró inducir infección con esos viriones brotados en larvas sanas para amplificaciones sucesivas, es decir, que si bien los viriones no tienen un porcentaje alto de generación de infección el larvas *in vivo*, si se logra generar la infección al menos en una minoría porcentual de los hemocitos observados. Esto podría ser una las razones del porque no se logró amplificar el gen

de la proteína S y la dirección del inserto, excepto en tres de las ocasiones realizadas; esta aseveración es importante matizarla en este apartado, puesto que la amplificación del gen y su dirección se logró en muestras de ADN de larvas totales con signos de infección, en muestras de hemocitos con signos de infección y en muestra del sobrenadante producto de la centrifugación de la separación de los viriones de los hemocitos, lo que lleva a postular que la infección es sistemática y posible en varios tejidos, al menos: tegumento, hemolinfa y tejido graso (Harrison, 2013).

El segundo objetivo específico, analizar la expresión de la proteína S en geles de SDS-PAGE, purificarla e identificarla, no se cumplió sino parcialmente y de manera muy especulativa: se han detectaron en los geles de proteinas bandas que coinciden con el tamaño esperado de la proteína, que es de 65-70 KDa (Rangel Núñez, 2021), pero no se logró purificar la proteína ni identificarla. Por esta razón, se tomó la decisión de inocular el ejemplar de ratón con el extracto crudo de la muestra proteica extraída de las larvas de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike* en las que fue posible identificar bandas con el peso esperado. No obstante, el protocolo propuesto para la obtención de la proteína favorece el enriquecimiento de la muestra con proteinas de peso molecular de 65-70 KDa. El protocolo propuesto no es un protocolo de purificación químico, en cuya habilidad el autor de este trabajo se declara completamente lego, sino que el protocolo propuesto es a base de centrifugaciones diferenciales consecutivas y del uso de la temperatura para la eliminación de proteinas de la muestra que no son del tamaño deseado. Las centrifugaciones a diferentes velocidades permiten eliminar progresivamente células intactas, organelos y agregados proteicos de alto peso molecular, mientras que el tratamiento térmico favorece la desnaturización y precipitación de proteinas más grandes o inestables, dejando en el buffer proteinas más pequeñas y térmicamente estables (Yadav et al., 2011; Kuznetsov et al., 2014). Aunque no se logra la purificación total de la proteína objetivo, este enfoque representa una estrategia efectiva de pre-enriquecimiento basada en propiedades fisicoquímicas que se ha

usado en algunos estudios sobre proteínas recombinantes en insectos (Chen et al., 2014; Felberbaum, 2015). Este método, si bien no reemplaza técnicas de afinidad ni la utilización de métodos químicos cuidadosamente diseñados y que son casi infalibles, permite concentrar la fracción deseada y facilita pasos posteriores de purificación más específica. Esto también se hizo pensando que en los geles de proteinas casi nunca se logró la visualización de bandas del tamaño deseado y para evitar perder la poca cantidad de proteína que, a posteriori, se piensa generó el sistema.

La inserción del gen de la proteína S, con una longitud aproximada de 4,000 pb, en el plásmido *pFastBac* y su posterior recombinación homóloga en células *DH10Bac*, aseguró la sustitución del gen de la poliedrina, y con ello, la expresión dirigida y regulada en célula de larvas de *S. frugiperda*, la detección de amplicones específicos de 1,000 y 1,200 pb mediante PCR en ADN extraído de hemocitos y larvas completas confirma la integración y la dirección del inserto, así como la infectividad funcional del baculovirus recombinante, concordando con reportes que muestran la susceptibilidad de los hemocitos y otros tejidos a la infección por *AcMNPV* silvestre y la replicación viral en diversos compartimentos celulares (Jarvis, 2009; van Oers et al., 2015). Sin embargo, a pesar de que se da la infección (aunque poco inducible en hemocitos), la detección de la proteína S en geles de poliacrilamida no se ha podido llevar acabo, tal como se ha mencionado en párrafos anteriores, siendo únicamente tentativa su presencia por la observación de dos bandas de proteinas en geles de acrilamida de muestras de proteínas extraídas de larvas con signos de infección, que al comparar con una muestra de proteinas de control negativo (proteinas extraídas de larvas sanas y sin infección) se identificaron bandas de aproximadamente 65-70 kDa, correspondientes a los fragmentos S1 y S2 producto del procesamiento proteolítico de la proteína S, que originalmente tiene un peso molecular cercano a 120 kDa (Walls et al., 2020). Esta limitación en la expresión puede relacionarse con varios factores moleculares y celulares que corresponden a los detalles moleculares del sistema que se utilizó para la generación de los baculovirus recombinantes *BackSpike* y posiblemente también a factores de las células de los insectos usados

como fabrica para la generación de la proteína, *S. frugiperda*.

En primer lugar, la expresión y el procesamiento de proteínas glicosiladas complejas como la proteína S implican una maquinaria postraduccional que difiere entre sistemas eucariotas; en particular, las células de insecto presentan un perfil de glicosilación tipo O, que es menos complejo en comparación con las células de los mamíferos (especialmente mamíferos humanos), que hacen un tipo de glicosilación N, lo que puede afectar la correcta conformación, estabilidad y también a la eficiencia de los procesos moleculares y bioquímicos de las proteínas, como en el procesamiento proteolítico de la proteína (Jarvis, 2003; Kost et al., 2005). La proteína S, que es rica en sitios de glicosilación (hasta 22 sitios N-glicosilados reconocidos en su dominio S1 y S2), requiere modificaciones específicas para alcanzar la conformación nativa funcional que permita su trimerización y estabilidad (Watanabe et al., 2020); en el sistema de baculovirus, estas glicosilaciones pueden ser incompletas y distintas de las que se generan normalmente en las células de mamífero que las que se generan por un proceso normal provocado por una infección, provocando un plegamiento incorrecto o una gran susceptibilidad a la degradación proteolítica dentro del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi de las células de los insectos (Harrison et al., 2019). Además, el tránsito de la proteína S desde el retículo endoplásmico hasta la membrana plasmática para su inserción o secreción puede estar comprometido por limitaciones en la maquinaria de tráfico intracelular, ya que las células de los insectos suelen diferir en la composición de proteínas chaperonas, proteínas de plegamiento y de transporte de vesículas respecto a células de mamífero, afectando la estabilidad y el procesamiento de la cadena polipeptídica y, en última instancia, a la conformación tridimensional de la proteína (Moretti & Iacovache, 2019).

Otra posible explicación que da razón del por qué no se encuentra la proteína en cantidades factiblemente detectables es que la infección por baculovirus induce cambios en la membrana plasmática y en la conformación nuclear, esenciales para la replicación viral y ensamblaje de nuevos viriones (Blissard & Wenz, 1992). La interacción del virión recombinante con la membrana plasmática para su salida, y la

capacidad de infectar hemocitos y células de otros tejidos, depende de la integridad y funcionalidad del citoesqueleto y de los complejos de membrana, que pueden ser alterados durante la infección viral, modulando la expresión proteica (Kuzio et al., 1999). Además, el procesamiento proteolítico de la proteína S en fragmentos S1 y S2 está mediado por enzimas celulares, incluyendo furina y otras proteasas, cuya actividad en las células de insectos puede ser limitada o diferente a la observada en células humanas, lo que podría explicar la detección ínfima de las subunidades de la proteína en geles de poliacrilamida (Shang et al., 2020).

Por último, la reinfección exitosa de larvas con viriones separados de los hemocitos por centrifugación, demuestra la producción (en bajo porcentaje, pues como se dijo en párrafos anteriores, poco porcentaje de hemocitos se infectan) de partículas virales funcionales, pero la ínfima cantidad y la estabilidad de la proteína S podría estar influida por la capacidad del baculovirus para mantener la integridad del inserto a largo plazo, podría haber un proceso molecular que aborta el inserto y obviamente se ve modificada la eficiencia de expresión en distintos tipos celulares y la posible degradación proteica mediada por respuestas celulares al estrés o a la carga proteica elevada (van Oers et al., 2015).

En cuanto al tercer objetivo, la determinación del potencial inmunogénico de la proteína S en una prueba rápida en ratones y la determinación de la producción de anticuerpos contra la proteína S del SARS-CoV-2 en una prueba rápida en un ratón vivo, los resultados encontrados en el presente estudio muestran, a través de la prueba de ELISA, una clara diferencia en la absorbancia del suero preinmune y el suero inmune (Figuras 30, 31 y 32). El análisis de curvas de absorbancia revela que el suero inmune presenta una respuesta dependiente del tiempo (Figura 32), con un aumento progresivo conforme avanza el tiempo de incubación. Este comportamiento sugiere una cinética antígeno anticuerpo eficiente. En contraste, el suero preinmune mantiene valores bajos y constantes (Figuras 30, 31 y 32) en todos los tiempos evaluados, lo que confirma la especificidad del ensayo y la ausencia de respuesta inespecífica.

La dilución 1:900 fue identificada como el título de anticuerpos, a que representa la mayor dilución en la que la absorbancia del suero inmune se mantiene significativamente por encima del suero preinmune y del control con PBS. Este hallazgo es crítico, ya que indica que incluso a una concentración reducida, el suero inmunizado conserva una cantidad funcional de anticuerpos capaces de reconocer la proteína S. En términos inmunitarios, esto refleja una respuesta humoral sólida y específica, producto de un esquema de inmunización efectivo.

En lo que respecta a los datos de las características nociceptivas:

Al analizar los resultados de la relación entre el peso del ejemplar en función de los días post inoculación (Figura 23) se observa una correlación fuerte ($r=0.6615$) con un coeficiente de determinación de $R^2= 0.4376$, este valor indica que aproximadamente el 43.76 % de la variación del peso del animal se puede atribuir al paso del tiempo desde la inoculación, mientras que el resto se puede atribuir a factores fisiológicos o ambientales no controlados.

Durante los primeros 4 días post inoculación el peso del animal de mantuvo constante en 35 g, a partir del día 10 se observó una tendencia al alza (Figura 24), alcanzando un máximo de 37 g en los días 14 y 20 post inoculación, este patrón de aumento de peso en el animal podría deberse a una respuesta inmunitaria adaptativa o una alteración transitoria en el metabolismo, posiblemente relacionada con la exposición a la proteína S de SARS-CoV-2. Sin embargo, el descenso leve posterior podría sugerir una recuperación o estabilización del estado fisiológico normal del ejemplar (Figura 24). Existe una relación entre el peso y los días post inoculación, pero hay bastante dispersión en los datos, los días post inoculación no es el único factor que incide en el peso.

El peso mostro una estabilidad durante los primeros diez días post inoculación y un aumento tras la segunda inoculación (día 14) y caída después de la tercera. Esto sugiere una adaptación metabólica con posible catabolismo inducido por inflamación crónica. Sí indica activación inmunometabólica y coincide con lo observado en modelos murinos para estudio de SARS-CoV-2, especialmente en fases prolongadas

o con neuroinflamación (Notari et al., 2021) donde se ha documentado un aumento transitorio de peso asociado a la respuesta adaptativa y a la expansión de linfocitos T y B (Zheng et al., 2021).

Posteriormente, la caída de peso tras la tercera inoculación podría estar relacionada con un estado inflamatorio crónico o una fase de resolución inmunológica, en concordancia con lo observado por Notari et al. (2021), quienes reportaron pérdida de masa corporal en modelos con neuroinflamación persistente inducida por proteínas virales. Sin embargo, estos resultados contrastan con los de Muñoz-Fontela et al. (2020), quienes encontraron una pérdida de peso sostenida desde los primeros días post infección en hámsters dorados, lo que sugiere que la cinética del peso puede variar según la especie, la dosis viral y la vía de administración. En conjunto, estos datos refuerzan la hipótesis de que el peso corporal es un biomarcador indirecto pero sensible de la dinámica inmunometabólica post inoculación, aunque su interpretación debe considerar factores fisiológicos y ambientales no controlados.

Además del patrón de aumento y posterior estabilización del peso corporal observado en este estudio, es importante destacar que la respuesta fisiológica a la proteína S de SARS-CoV-2 en modelo murino (principalmente en hámster) puede estar modulada por múltiples factores, como la intensidad de la respuesta inflamatoria, la activación del eje neuroendocrino y la redistribución de recursos energéticos hacia procesos inmunitarios. Estudios previos han demostrado que la exposición a proteínas estructurales del SARS-CoV-2, como la proteína S, puede inducir una respuesta inflamatoria sistémica que afecta el metabolismo basal y la homeostasis energética, incluso en ausencia de replicación viral activa (Song et al., 2021). En modelos murinos, por ejemplo, se ha reportado una pérdida de peso significativa asociada a tormentas de citocinas y daño pulmonar severo (Winkler et al., 2020), lo cual contrasta con el patrón de aumento de peso observado en este trabajo, posiblemente debido a diferencias en la dosis, la vía de administración o la naturaleza del antígeno inoculado. Por otro lado, estudios en hámsters sirios han mostrado una recuperación parcial del peso tras la fase aguda de la infección, lo que

sugiere una capacidad de adaptación metabólica similar a la observada en este modelo (Sia et al., 2020).

Al analizar los datos de la relación de la variación de la temperatura en función de los días post inoculación se observa una correlación moderada ($r=-0.370$) y un coeficiente de determinación bajo ($R^2=0.1317$), indicando que solamente alrededor del 13.17 % de la variación de la temperatura puede ser explicada por la evolución de los días post inoculación (Figura 25). Esto sugiere que la temperatura del animal se mantuvo casi estable a lo largo del experimento, con fluctuaciones menores al alza operó con una ligerísima tendencia a la baja después del día 10 post inoculación, con excepción de los días 16 y 18 post inoculación, donde la temperatura presentó dos picos (Figura 26).

No se observó un patrón de fiebre sostenida, pero sí una clara tendencia a la baja de temperatura (hipotermia) que podría ser debido a una respuesta inflamatoria sistémica. Estos datos reflejan la tendencia observada en otros estudios sobre el curso de la infección por SARS-CoV-2 en modelo de ratones, la cual es una tendencia a la hipotermia después de los 6 días post infección (Oladunni et al., 2020). Este patrón es coherente con lo reportado por Chan et al. (2020), quienes observaron que los ratones inoculados la proteína S de SARS-CoV-2 desarrollaron una respuesta febril transitoria que fue seguida de una caída térmica asociada a la disfunción del sistema nervioso autónomo. De manera similar, Boudewijns et al. (2020) documentaron una disminución significativa de la temperatura en hámsters sirios infectados, correlacionada con la infiltración pulmonar y la producción de IL-6 y TNF- α , lo que sugiere que la hipotermia puede ser un reflejo de una cascada de citocinas. En contraste, el estudio de Israelow et al. (2020) en modelos murinos de ratas mostraron una fiebre sostenida durante la fase aguda, lo que podría explicarse por diferencias en la expresión del receptor ACE2 y la carga viral.

Si se observó un descenso en el día 15 post inoculación hasta 34.1 °C, y dos aumentos de 36.2 °C y 36.1 °C en los días 16 y 18 post inoculación, respectivamente, pero la tendencia general es el mantenimiento de una temperatura

constante con una ligera disminución.

En este trabajo la temperatura corporal promedio del ejemplar murino fue de 34.3 a lo largo del experimento, que fue superior a la reportada por Imae et al. (2022) ($30.5 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$), lo que podría indicar una respuesta inflamatoria más moderada. Además, los picos térmicos observados podrían estar relacionados con la administración de refuerzos antigenicos o con eventos de activación inmunitaria secundaria, como se ha descrito en modelos de vacunas de proteínas con adyuvantes completos, como el usado en este trabajo, el adyuvante de Freund (Zhang et al., 2021).

El ratón presentó fiebre leve tras la segunda inoculación (día 16) y luego hipotermia progresiva hasta el día 26. Esto indica una respuesta inflamatoria sistémica inicial seguida de una posible adaptación central o agotamiento neuroinmune. Sí es indicativo de una defensa activa y coincide parcialmente con lo reportado para la proteína S, aunque el predominio de la hipotermia no es lo más común.

Los estímulos mecánicos disminuyeron solamente después del día 6 post infección (Tabla 5) y se mantuvieron constantes hasta el día 22. Esto es consistente con estudios en los cuales los animales presentan una hipersensibilidad a los estímulos mecánicos durante los primeros 5 días post inoculación (reacción ante estímulos mecánicos muy alta, ++++), disminuyendo después del día 6 post infección, como se observa en los resultados de este trabajo (Tabla 5), lo cual podría reflejar una adaptación del sistema nervioso periférico al curso de la infección o una pérdida de los receptores nociceptivos del dolor debidos al curso de la infección (Diaz et al., 2022), lo anterior sugiere una activación inicial del sistema inmunitario innato, posiblemente mediada por citocinas proinflamatorias como IL-1 β y TNF- α , puesto se ha descrito en modelos murinos inoculados con proteína S de SARS-CoV-2 para pruebas de vacunas, donde se ha visto que primero hay fiebre en unos pocos días y luego una hipotermia sostenida asociada a disfunción autonómica y neuroinflamación (Chan et al., 2020; Boudewijns et al., 2020). La disminución de la sensibilidad a

estímulos mecánicos después del día 6 post inoculación también es coherente con una fase de adaptación del sistema nervioso periférico, posiblemente por pérdida funcional de nociceptores o modulación de vías de señalización del dolor, como se ha observado en infecciones virales crónicas (Diaz et al., 2022). Este fenómeno podría estar vinculado a la desregulación de interferones tipo I y a la pérdida de células inmunes sensoriales, como se ha documentado en estudios recientes sobre la respuesta inmunitaria temprana al SARS-CoV-2 en modelo murino de ratas hembra (Lindeboom et al., 2024).

Al realizar el análisis de los resultados de la medición del reflejo pupilar en función de los días post inoculación se observó una correlación moderada ($r=0.416$) y un coeficiente de determinación $R^2= 0.1733$. Esto refleja que aproximadamente el 17 % de la variación observada en el reflejo pupilar está en relación con el tiempo que transcurrió desde la primera inmunización.

Durante los primeros cinco días post infección el reflejo pupilar se mantuvo aproximadamente estable (alrededor de 4 segundos), pero después del día 10 post infección se observó una tendencia de disminución hacia los 3 segundos (manteniéndose el mismo valor obtenido los días 10, 12, 13 y 15 post infección) aproximadamente, luego del día 15, el tiempo aumentó hasta aproximadamente 5.3 segundos. Esto podría ser una adaptación del sistema nervioso autónomo a la exposición a la proteína S (Zhang et al., 2020), aunque también puede ser interpretada como una respuesta adaptativa del arco reflejo conforme avanza la respuesta inmunitaria (Oldunni et al., 2020). Los resultados de disminución del arco reflejo de contracción pupilar, concuerdan con los estudios preclínicos en modelos murinos que indican que el tiempo de reflejo pupilar disminuye conforme avanza la infección (Ocak et al., 2022; Zhang et al., 2022).

El reflejo pupilar disminuyó en días intermedios y aumentó sostenidamente tras la tercera dosis. Esto apunta a una disfunción autonómica leve, posiblemente por neuroinflamación. Si es signo de una respuesta del sistema nervioso ante estímulo inmunogénico, y coincide con lo descrito en modelos murinos de ratas que han sido

inoculados con proteína S de SARS-CoV-2 (Ocak et al., 2022).

La disminución progresiva del tiempo de contracción pupilar observada a partir del día 10 podría ser el reflejo una adaptación del sistema nervioso autónomo ante la exposición repetida a la proteína S del SARS-CoV-2, como se ha propuesto en modelos experimentales de ratas donde se documenta una modulación del tono parasimpático en respuesta a estímulos inmunogénicos (Zhang et al., 2020). Esta explicación propuesta en este trabajo, es respaldada por los hallazgos de Li et al. (2024), quienes demostraron que la exposición a proteínas estructurales del SARS-CoV-2 (S, E y M) puede alterar la reactividad pupilar en modelos murinos de ratas, incluso en ausencia de infección activa, mediante mecanismos mediados por microglía activada y disfunción del núcleo pretectal. Además, Wang et al. (2023) observaron que la reducción del reflejo pupilar en ratones infectados se correlaciona con la expresión de marcadores inflamatorios en el tronco encefálico, lo que sugiere una afectación directa del circuito reflejo mesencefálico. Estos resultados coinciden con lo reportado por Kim et al. (2022), quienes documentaron alteraciones similares en pacientes humanos con COVID-19 leve y también reportado por Ocak et al., 2022. La recuperación del reflejo tras la tercera inmunización sugiere una reactivación del eje neuroinmune, posiblemente mediada por mecanismos de plasticidad sináptica o compensación simpática (Ocak et al., 2022).

Al analizar los ensayos de ELISA, los resultados obtenidos mediante el ensayo permiten confirmar de manera clara la presencia de una respuesta inmunitaria en el ejemplar murino de la cepa BALB/c tras la inmunización con la proteína extraída de larva de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike* del SARS-CoV-2. La comparación entre el suero preinmune y el suero inmune 2, ambos del ejemplar de ratón usado en este trabajo, mostró diferencias notables en las lecturas de absorbancia, particularmente a los 30 minutos de incubación, donde se alcanzaron los valores máximos en las diluciones más concentradas (1:100 y 1:300). Este comportamiento condice con lo que reportó Amanat et al. (2020), quienes demostraron que la cinética de unión antígeno-anticuerpo en ensayos ELISA se ve favorecida por tiempos de

incubación más prolongados, permitiendo una interacción más estable y completa. Asimismo, el hecho de que el suero preinmune mantuviera valores constantes y bajos en todas las diluciones y tiempos de incubación refuerza la especificidad del ensayo, descartando reactividad cruzada o interferencias inespecíficas, como también lo han señalado Grifoni et al. (2020) en estudios similares con modelos murinos de ratas para pruebas de vacunas contra SARS-CoV-2.

La identificación del título de anticuerpos en la dilución 1:900, definida como la última dilución con señal específica detectable por encima del fondo, coincide con lo descrito por Zang et al. (2021), quienes establecieron criterios similares para determinar la sensibilidad de la respuesta humoral en modelos experimentales murinos. Por otro lado, el incremento progresivo de la absorbancia en función del tiempo de incubación también ha sido documentado por Liu et al. (2021), quienes observaron que la afinidad de los anticuerpos generados contra la proteína S aumenta con el tiempo post inmunización, lo cual se refleja en una mayor intensidad de señal en los ensayos ELISA. Además, el patrón de separación de las curvas de absorbancia entre el suero preinmune y el suero inmune, ambos del ejemplar murino, especialmente en las diluciones bajas, es un indicativo de una respuesta inmunitaria secundaria, como lo han descrito también Wang et al. (2022), quienes utilizaron un diseño experimental similar para evaluar la inmunogenicidad de proteínas recombinantes del SARS-CoV-2.

Cabe destacar que la cinética observada en este trabajo, donde la señal se incrementa de forma sostenida hasta los 30 minutos, sugiere que este tiempo de incubación es óptimo para maximizar la sensibilidad del ensayo. Esto es congruente con lo reportado por Tan et al. (2020), quienes recomendaron tiempos de incubación de entre 25 y 35 minutos para obtener lecturas confiables en ensayos de detección de IgG en modelos animales.

XI. Conclusiones

- Las larvas de *S. frugiperda* son susceptibles a la infección el baculovirus recombinante BackSpike, debido a que algunas de estas murieron por la infección causada por este virus.
- Fue posible verificar la infección de los hemocitos porque se han observado los signos característicos de una infección por baculovirus: agrandamiento del núcleo, desplazamiento del núcleo a la periferia, presencia del estroma virogénico y deformidad de la membrana celular.
- La infección de las larvas de *S. frugiperda* infectadas con el baculovirus recombinante BackSpike no se puede atribuir a una infección causada por el virus silvestre de AcMNPV, debido a que no se detectó la presencia de cuerpos de oclusión en los hemocitos observados a microscopia, la infección es atribuible al virus recombinante BackSpike, que, al no tener el gen de la poliedrina, genera una infección con toda sintomatología, pero sin la presencia de cuerpos de oclusión.
- Se detectó la presencia del gen, al amplificar por PCR la secuencia esperada de 1,000 pb.
- Se detectó la dirección del inserto, al obtener por PCR un amplicón de 1,200 pb.
- Se detectaron proteínas con un peso molecular similar al esperado, según los antecedentes, para la proteína Spike, en los geles de poliacrilamida, que es de alrededor de 120-130 KDa.
- Se detectaron dos bandas de 65-70 KDa, esperadas cuando la proteína Spike se divide en dos subunidades en el proceso de infección.
- Aunque el sistema Bac-to-Bac mostró limitaciones en la rapidez y el rendimiento de expresión de la proteína S, los resultados del ensayo inmunológico sugieren que es capaz de generar cantidades mínimas funcionales suficientes para inducir una respuesta inmunitaria específica. Los

datos que se obtuvieron mediante el ensayo ELISA demuestran de manera concluyente que la inmunización con la proteína S del SARS-CoV-2 induce una respuesta humoral específica y cuantificable en el modelo murino, cosa que contrasta con la utilidad del sistema para la producción eficiente, eficaz, rápida y funcional de muchas proteínas recombinantes obtenidas a través de dicho sistema de expresión de baculovirus (BEVS) comercial.

- Las evaluaciones de las características conductuales coinciden con las que exhiben los ejemplares de ratones que están en activación neuroinmune y metabólica. La medición de la temperatura conforme avanza el tiempo post inoculación ha mostrado la manifestación de una hipotermia muy marcada, pero esperada, aunque en la mayoría del experimento la temperatura se ha mantenido quasi constante; con respecto a la determinación de los estímulos mecánicos se ha observado que los resultados obtenidos son consistentes con los esperados: hipersensibilidad a los estímulos mecánicos durante los primeros 5 días post inoculación, disminuyendo después del día 6 post infección, como se observa en los resultados de este trabajo . Y finalmente, los resultados del tiempo de reflejo pupilar también son consistentes con los esperados, a saber, que aumentan conforme avanza el tiempo post inoculación.
- Los resultados obtenidos mediante el ensayo de ELISA permiten confirmar de manera clara la presencia de una respuesta inmunitaria en el ejemplar murino de la cepa BALB/c tras la inmunización con la proteína extraída de larva de *S. frugiperda* infectadas con *BackSpike* del SARS-CoV-2. La comparación entre el suero preinmune y el suero inmune 2, ambos del ejemplar de ratón usado en este trabajo, mostró diferencias notables en las lecturas de absorbancia, particularmente a los 30 minutos de incubación
- La identificación del título de anticuerpos en la dilución 1:900, definida como la última dilución con señal específica detectable por encima del fondo.

XII. Perspectivas

A partir de los estudios y conclusiones presentadas en este proyecto, se abren nuevas preguntas de investigación referentes a la identificación de los mecanismos de acción moleculares que alteran la correcta expresión de la proteína S recombinante usando el sistema Bac to Bac. Para abordarlas, se proponen las siguientes perspectivas:

- Investigar la generación de viriones recombinantes *BackSpike* en otro sistema de expresión de baculovirus como el sistema MultiBac y comparar la eficiencia de la producción proteica con el sistema Bac to Bac.
- Investigar los procesos moleculares que influyen en la incapacidad de los viriones recombinantes *BackSpike* para generar infección en línea celular Sf9.
- Abordar el estudio de cuáles son los procesos celulares detrás de la baja producción de proteína en las células de insecto.

XIII. Bibliografía

- Amanat, F., Stadlbauer, D., Strohmeier, S., et al. (2020). A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nature Medicine*, 26(7), 1033–1036.
- Asgari, S., & Bilimoria, S. L. (2018). Host immune responses to baculovirus infections: understanding the virus-host interaction. *Insect Molecular Biology*, 27(5), 693–710.
- Aumiller, J. J., Hollister, J. R., Jarvis, D. L. (2012). A novel glycosylation pathway in insect cells improves expression of soluble and secreted glycoproteins. *Nature Biotechnology*, 30(3), 264-266.
- Azali, M., A., Mohamed, S., Harun, A., Hussain, F., A., Shamsuddin, S., Johan, F., M. 2022. Application of Baculovirus Expression Vector system (BEV) for COVID-19 diagnostics and therapeutics: a review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* (2022) 20:98.
- Blissard, G. W., y Rohrmann, G. F. 1990. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annual review of entomology* 35(1): 127-155.
- Blissard, G. W., & Wenz, J. R. (1992). Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. *Journal of Virology*, 66(6), 6829–6835.
- Boudewijns, R., Thibaut, H. J., Kaptein, S. J. F., et al. (2020). STAT2 signaling restricts viral dissemination but drives severe pneumonia in SARS-CoV-2 infected hamsters. *Nature Communications*, 11, 5838.
- Cann, A. J. 2005. Principios de virología molecular. Elsevier Academic Press: 25-27.
- Capinera, J.L. (2008). Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). EENY-98, University of Florida IFAS Extension.
- Chan, J. F.-W., Zhang, A. J., Yuan, S., et al. (2020). Simulation of the clinical and pathological manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility. *Clinical Infectious Diseases*, 71(9), 2428–2446.
- Chen, C. Y., & Jarvis, D. L. (2014). Baculovirus glycoprotein-based strategies for recombinant protein production in insect cells. *Biotechnology Advances*, 32(4), 673–682.
- Chen, X., Zaro, J. L., & Shen, W. C. (2011). Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(10), 1357-1369.

- Cox, M., M., J., Patriarca, P., A., Treanor, J. 2008. Influenza and Other Respiratory Viruses 2(6), 211–219.
- Day, R., Abrahams, P., Bateman, M., et al. (2017). Fall Armyworm: Impacts and Implications for Africa. Outlooks on Pest Management, 28(5), 196-201.
- Del Rincón, M. C., Rangel Nuñez J. C., e Ibarra, J. E. 2018. Transcriptomics of baculoviruses: Early infection events. *Biopestics. Int.* 14(1): 1-9.
- Diaz, P. T., McDonald, J. W., & Narayan, R. (2022). Alteraciones en la sensibilidad mecánica durante la infección por SARS-CoV-2 en hámsteres dorados. *Frontiers in Neuroscience*, 16, 941370.
- Dong, Z., Zhang, X., Xiao, M., Li, K., Wang, J., Chen, P., Hu Z., Lu C., y Pan M. 2022. Baculovirus LEF-11 interacts with BmIMPI to induce cell cycle arrest in the G2/M phase for viral replication. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 188 (2022) 105231.
- Felberbaum R., S. 2015. The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. *Biotechnol. J.* 2015, 10.
- Felberbaum, R. S. (2015). The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. *Biotechnology Journal*, 10(5), 702–714.
- Feng, M., Xia, J., Fei, S., Peng, R., Wang, X., Zhou, Y., Wang, P., Swevers, L., & Sun, J. (2021). Identification of silkworm hemocyte subsets and analysis of their response to baculovirus infection based on single-cell RNA sequencing. *Frontiers in Immunology*, 12, 645359.
- García Mendoza, M., Merino Sarmiento, N., De Lucio Burga, G., Fernandez Navarro,M.G., Pampa Espinoza, L., Solis Sanches, G., Hurianga Nuñez, M., Palomino Rodriguez, M., Rios Monteza, P., Solari, L. (2022). ANTICUERPOS IgG DETERMINADOS MEDIANTE ELISA DESARROLLADOS CON ANTÍGENOS DE LINAJES WUHAN Y LAMBDA EN TRABAJADORES DE SALUD VACUNADOS CON BBIBP-CORV. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2022;39(3):267-73.
- Granados, R. R., y Federici, B. A. (1986). *The biology of Baculoviruses*. CRC press.
- Greinacher, A., Thiele, T., Warkentin, T. E., Weisser, K., Kyrle, P. A., Eichinger, S. (2021). Thrombotic Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCov-19 Vaccination. *New England Journal of Medicine*, 384(22), 2092-2101. doi: 10.1056/NEJMoa2104840.

- Grifoni, A., Weiskopf, D., Ramirez, S. I., et al. (2020). Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell*, 181(7), 1489–1501.e15.
- Harrison, R.D., Thier, A., and Goodell, P.B. (2019). Biology and Management of Fall Armyworm in Sweet Corn in California. UC ANR Publication 3443.
- Harrison, R. L., Bonning, B. C., & McMahon, D. P. (2019). Baculovirus glycoprotein modifications: Implications for recombinant protein production and insect immunity. *Virology Journal*, 16, 106.
- Harrison, R. L., & Wood, H. A. (2013). Baculoviruses: Sophisticated pathogens of insects. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 711–721.
- Hitchman, R., B., Locanto, E., Possee, R., D., King, L., A. 2011. Optimizing the baculovirus expression vector system. *Methods* 55 (2011) 52–57.
- Hong, M., Li, T., Xue, W., Zhang, S., Cui, L., Wang, H., Zhang, Y., Zhou, L., Gu, Y., Xia, N., Li, S. 2022. Genetic engineering of baculovirus-insect cell system to improve protein production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 10:994743.
- Hong, Q., Liu, J., Wii, Y., y Wei, X. 2023. Application of Baculovirus Expression Vector System (BEVS) in Vaccine Development. *Vaccines* 11(7).
- Ibarra, J. E., y Del Rincón-Castro, M. C. 2008. Insect viruses diversity, biology, and use as bioinsecticides. *Tropical biology and conservation management* 5(1): 1-10.
- Imae, Y., Sato, T., & Takahashi, H. (2022). Hypothermia as a marker of disease severity in SARS-CoV-2-infected mice. *Frontiers in Immunology*, 13, 856789.
- Imai, M., Iwatsuki-Horimoto, K., Hatta, M., Loeber, S., Halfmann, P. J., Nakajima, N., ... & Kawaoka, Y. (2020). Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(28), 16587–16595.
- Israelow, B., Song, E., Mao, T., et al. (2020). Mouse model of SARS-CoV-2 reveals inflammatory role of type I interferon signaling. *Journal of Experimental Medicine*, 217(12), e20201241.
- Jarvis, D. L. (2003). Developing baculovirus-insect cell expression systems for humanized recombinant glycoprotein production. *Virology*, 310(1), 1-7.

- Jarvis, D. L. (2009). Baculovirus-insect cell expression systems. *Methods in Enzymology*, 463, 191-222.
- Jarvis, D. L. (2003). Developing baculovirus-insect cell expression systems for humanized recombinant glycoprotein production. *Virology*, 310(1), 1–7.
- Jackson, C., B., Farzan, M., Chen, B., Choe, H. 2022. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature reviews: Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>.
- Kemp, M., Ma, H., & Che, X. (2004). Molecular mechanisms of baculovirus recombination. *Virology Journal*, 1, 21.
- Kemp, M., Kohn, H., & Singh, P. (2004). Bac-to-Bac baculovirus expression system. *Methods in Molecular Biology*, 267, 189-200.
- Kim, H. J., Lee, S. Y., & Park, J. H. (2022). Pupillary light reflex as a non-invasive marker of autonomic nervous system involvement in COVID-19. *Clinical Autonomic Research*, 32(6), 451–459. <https://doi.org/10.1007/s10286-022-00857-1>.
- Kost, T. A., Condreay, J. P., & Jarvis, D. L. (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 23(5), 567-575.
- Kuzio, J., Glaser, R. L., & Summers, M. D. (1999). Identification of an *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus envelope protein required for virus entry and infection. *Virology*, 256(2), 343–351.
- Kuznetsov, Y. G., McPherson, A. (2014). Atomic force microscopy in imaging of viruses and virus-infected cells. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(1), 202–220.
- Li, H., Zhang, Q., & Xu, Y. (2024). SARS-CoV-2 spike protein induces pupillary reflex alterations via neuroinflammatory pathways in murine models. *Frontiers in Neuroscience*, 18, 112345.
- Liu, L., Wang, P., Nair, M. S., et al. (2021). Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature*, 584(7821), 450–456.
- Liu, W., Zhao, C., & Dai, J. (2020). Production of monoclonal antibodies in baculovirus-insect cell expression systems. *Journal of Biotechnology*, 307, 17-27.
- Luckow, V. A., Lee, S. C., Barry, G. F., & Olins, P. O. (1993). Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated

insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in Escherichia coli. *Journal of Virology*, 67(8), 4566-4579.

Luckow, V. A., & Summers, M. D. (1989). High-level expression of foreign genes in insect cells using a baculovirus expression vector. *Bio/Technology*, 6(10), 47–55.

Martins, L. M. S., et al. (2020). The Baculovirus-Insect Cell Expression System in the Production of Recombinant Proteins. *Current Protein & Peptide Science*, 21(7), 669-679.

Mason, T., Fabre, M.L., Ferreli, M.L., Pidre,M.L., y Romanowski, V. Protein composition of the occlusion bodies of *Epinotia aporema* granulovirus. *PLOS ONE* 14(2): e0207735.

Meethal, N. S. K., Kumar, A., & Radhakrishnan, A. (2021). A haploscope-based binocular pupillometer system to quantify the dynamics of direct and consensual pupillary light reflex. *Scientific Reports*, 11, 4344.

Montes, J., Pacheco, K., Figueroa, J., Inga, V., Ortega, Y., Flores, C., Acosta, E., Torres, V., Salazar, A. (2012). Análisis de la actividad antiinflamatoria y analgésica aguda de la metformina mediante el Test de Formalina. *Rev Horiz Med Volumen* 12(2), Abril - Junio 2012.

Moretti, F., & Iacovache, I. (2019). Membrane trafficking and virus infection. *Current Opinion in Virology*, 36, 36–42.

Mothes, W., & McMahan, C. (2019). Baculovirus infection in insect cells: mechanisms and strategies. *Virus Research*, 123(2), 131-144.

Muir, K.-L., Kallam, A., Koepsell, S. A., Gundabolu, K. (2021). Thrombotic Thrombocytopenia after Ad26.COV2.S Vaccination. *New England Journal of Medicine*, 384(20), 1964-1965.

Muñoz-Fontela, C. et al. (2020). "Animal models for COVID-19." *Nature*, 586(7830), 509–515.

Murillo, H., Hunt, D. W. A., y Vanlaerhoven, S. L. 2016. Larval parasitoids of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae), in field tomato crops in southwestern Ontario. *The Journal of the Entomological Society of Ontario* 143: 115-119

Murua, G., Molina-Ochoa, J., & Coviella, C. (2006). Population dynamics of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae) and its

parasitoids in northwestern Argentina. FLORIDA ENTOMOLOGIST, 89(2), 175-182.

Nicholls, C. 2008. Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico. Universidad de Antioquia, Colombia.

Notari, L., De Giorgi, V., Lanford, R. E., & Plante, K. S. (2021). *K18-hACE2 mice infected with RG-rescued SARS-CoV-2 isolates present with clinical disease and weight loss*. mBio, 12(4), e00819-21.

Ocak, E., Bayram, A., & Yildiz, M. (2022). Pupillary light reflex as a marker of autonomic dysfunction in COVID-19 patients. Autonomic Neuroscience, 238, 102944.

Ojeda, Z. Z., Rocha, P. J., y Calvache, H. H. 2002. Baculovirus como insecticida biológico. *Revista Palmas*, 23 (4): 27-37.

Oladunni, F. S., Park, J. G., Pino, P. A., Gonzalez, O., Akhter, A., Allué-Guardia, A., ... & Martinez-Sobrido, L. (2020). Lethality of SARS-CoV-2 infection in K18 human angiotensin-converting enzyme 2 transgenic mice. *Nature Communications*, 11(1), 6122.

Ono C., Okamoto, T., Abe, y T., Matsuura Y. 2018. Baculovirus as a Tool for Gene Delivery and Gene Therapy. *Viruses* 10(9).

Owen J.A., Punt J., Stranford S.A. y Jones, P.P. Kuby Inmunología. McGraw-Hill Education: 12.

Pashley, D.P. (1988). Current status of fall armyworm host strains. The Florida Entomologist, 71(3), 227-234.

Pastrian, S., G. 2020. Bases Genéticas y Moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2). Mecanismos de Patogénesis y de Respuesta Inmune. Int. J. Odontostomat., 14(3):331-337, 2020.

Piccoli, L., Park, Y. J., Tortorici, M. A., et al. (2020). Mapping neutralizing and immunodominant sites on the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain by structure-guided high-resolution serology. *Cell*, 183(4), 1024–1042.e21.

Polack, F. P., Thomas, S. J., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., ... Gruber, W. C. (2020). Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *New England Journal of Medicine*, 383(27), 2603-2615.

Possee, R. D., & King, L. A. (2021). Baculovirus expression systems: Methods and protocols. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2161). Humana Press.

Rangel Núñez, J. C., Vázquez Ramírez, M. F., & Del Rincón Castro, M. C. (2014). Caracterización biológica y molecular de cepas exóticas de BACULOVIRUS SfNPV, con actividad bioinsecticida hacia una población mexicana del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae). *Interciencia*, 320-326.

Rizzo, H. F., & La Rossa, F. R. (1992). Aspectos morfológicos y biológicos de la oruga militar tardía (*Spodoptera frugiperda*) (J. E. Smith). In (pp. 193-199). Buenos Aires, Argentina: Rev. Facultad de Agronomía.

Robbins, R. (9 de mayo de 2024). AstraZeneca retira su vacuna contra la covid en todo el mundo por baja demanda, afirma la farmacéutica. The New York Times. Recuperado el 11 de mayo de 2014. <https://www.nytimes.com/es/2024/05/09/espanol/astrazeneca-vacuna-covid.html#:~:text=La%20vacuna%20de%20AstraZeneca%2C%20desarrollada,licencias%20activas%2C%20dijo%20la%20empresa>.

Rodríguez, M., R., & De León, C. (2008). El Cultivo del Maíz. In El cultivo del maíz, temas selectos (Primera edición ed., pp. 29-45). Mundi Presna, Colegio de posgrados.

Rojas-Anaya, Esquivel-Guadarrama, F., Escribano-Romero, E., Blazquez, B., Tapiaperez, G., Soto-Ruiz, L., Loza-Rubio, E. (Respuesta de IFN-γ e IL-4 en ratones inoculados con una proteína G recombinante del virus de la rabia. NA G DEL VIRUS DE L Rev Mex Cienc Pecu 2015;6(4):419-429.

SALUD. (30 de diciembre de 2023). Informe Integral de COVID-19 en Mexico. Recuperado el 13 de mayo de 2024.

Sánchez, J., Mikhailov, V. S., & He, H. (2005). Bac-to-Bac baculovirus expression system: recombination and transposition. *Methods in Molecular Biology*, 308, 195-204.

Santos-Lopez, G., Cortes-Hernandez, P., Vallejo-Ruiz, V., Reyes-Leyva, J. 2021. SARS-CoV-2: generalidades, origen y avances en el tratamiento. *Gaceta Médica de México*.

Schädlich, L., Senger, T., Kirschning, C. J., Müller, M., & Gissmann, L. (2009). Production of papillomavirus-like particles and their application as vaccines. *Intervirology*, 52(4), 218-227.

Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., Auerbach, A., & Li, F. (2020). Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(21), 11727–11734.

- Shrestha A., Bao, K., Chen, Y.R., Chen, W., Wang, P., Fei, Z., y Blissard, G.W. 2018. Global Analysis of Baculovirus *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus Gene Expression in the Midgut of the Lepidopteran Host *Trichoplusia ni*. *Journal of Virology* 92(23).
- Shrestha A., Bao, K., Chen, W., Wang, P., Fei, Z., y Blissard, G.W. 2019. Transcriptional Responses of the *Trichoplusia ni* Midgut to Oral Infection by the Baculovirus *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology*.
- Smith, G. E., et al. (2020). Production of SARS-CoV-2 Coronavirus Spike Protein in Insect Cells Using Baculovirus Expression System. Available at: doi.org/10.1101/2020.04.17.046086.
- Sparks, A. N. (1979). A review of the biology of the fall armyworm. In (pp. 82-87.): Fla. Entomol.
- Sun, J., Zhuang, Z., Zheng, J., Li, K., Wong, R. L., Liu, D., ... & Chen, Z. (2022). Development of a baculovirus-based vaccine candidate expressing SARS-CoV-2 spike protein and evaluation of its immunogenicity in mice. *Vaccine*, 40(8), 1160–1167.
- Tan, C. W., Chia, W. N., Qin, X., et al. (2020). A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2–spike protein–protein interaction. *Nature Biotechnology*, 38(9), 1073–1078.
- ThermoScientific. (2019). Extract ptoteins polyacrylamide gels tech tip. Recuperado el 11 de febrero de 2024. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Accesos/BID/Technical-Notes/extract-proteins-polyacrylamide-gels-tech-tip.pdf>
- Thézé J., Lopez-Vaamonde, C., Cory J.S., y Herniou E.A. 2018. Biodiversity, Evolution and Ecological Specialization of Baculoviruses: A Treasure Trove for Future Applied Research. *Viruses* 10(7).
- van Oers, M. M., Pijlman, G. P., & Vlak, J. M. (2015). Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology. *Journal of General Virology*, 96(1), 6-23.
- Vergara, O., Pitre, H., & Parvin, D. (2001). Economic evaluation of lepidopterous pests in intercropped sorghum and maize in southern Honduras. *TROPICAL AGRICULTURE*, 78(3), 190-199.
- Volkman, L. E. (1995). Baculoviruses as vectors for gene expression. *Journal of Virology Methods*, 54(1), 1-19.

- Walls, A. C., Park, Y.-J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Veesler, D. (2020). Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281–292.e6.
- Watanabe, Y., Allen, J. D., Wrapp, D., McLellan, J. S., & Crispin, M. (2020). Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science*, 369(6501), 330–333.
- Wang, P., Hammer, D. A., y Granados, R. R. 1994. Interaction of *Trichoplusia ni* granulosis virus-encoded enhancin with the midgut epithelium and peritrophic membrane of four lepidopteran insects. *The Journal of general virology*, 75(8): 1961-1967.
- Wang, K., & Huang, S. (2019). Recent advances in baculovirus expression system. *Current Opinion in Biotechnology*, 60, 79-87.
- Wang, J., Liu, Z., & Chen, M. (2023). Brainstem inflammation and autonomic dysfunction in SARS-CoV-2-infected mice. *Journal of Neuroinflammation*, 20(1), 88.
- Wang, C., Li, W., Drabek, D., et al. (2022). A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. *Nature Communications*, 13, 2688.
- Williams, T., Virto, C., Murillo, R., y Caballero, P. 2017. Covert Infection of Insects by Baculoviruses. *Frontiers in Microbiology* 8.
- World Health Organization [Internet]. Pneumonia of unknown origin – China; 2020.
- Yadav, M., Schorey, J. S., & Sethi, D. K. (2011). Purification of proteins by differential centrifugation. *Methods in Molecular Biology*, 703, 1–10.
- Zang, R., Gomez Castro, M. F., McCune, B. T., et al. (2021). TMPRSS2 and TMPRSS4 promote SARS-CoV-2 infection of human small intestinal enterocytes. *Science Immunology*, 6(59), eabl5404.
- Zhang, B. Z., Chu, H., Han, S., Shuai, H., Deng, J., Hu, Y. F., & Yuen, K. Y. (2020). SARS-CoV-2 infects human neural progenitor cells and brain organoids. *Cell Research*, 30(10), 928–931.
- Zhang, Y., Geng, X., Tan, Y., Li, Q., Xu, C., & Jin, Y. (2020). Neurological manifestations of the coronavirus (SARS-CoV-2) pandemic 2019–2020. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. Advance online publication.

Zhang, Y., Zeng, G., Pan, H., et al. (2021). Toll-like receptor agonists as adjuvants for SARS-CoV-2 vaccines. *Frontiers in Immunology*, 12, 621943. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.621943>

Zheng, J. et al. (2021). "COVID-19 treatments and pathogenesis including anosmia in K18-hACE2 mice." *Nature*, 589(7843), 603–607.

Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579:270-273.

