

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DISEÑO DE UNA VACUNA CONTRA EL VIRUS H5N1 EN MICROALGAS  
USANDO UNA PLATAFORMA INMUNOINFORMÁTICA ABIERTA

POR

DANIEL MISAEL GARZA GARCÍA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

2024

DISEÑO DE UNA VACUNA CONTRA EL VIRUS H5N1

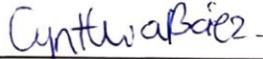
EN MICROALGAS USANDO UNA PLATAFORMA

INMUNOINFORMÁTICA ABIERTA

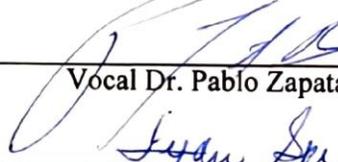
Comité de Tesis



Presidente Dr. Juan Manuel Alcocer González



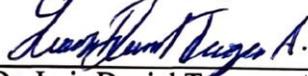
Secretario Dra. Cynthia Aracely Alvizo Báez



Vocal Dr. Pablo Zapata Benavides



Vocal Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales



Vocal Dr. Luis Daniel Terrazas Armendáriz



Subdirección de Posgrado  
Subdirector de Posgrado Dra. Katiuska Arevalo Niño

DISEÑO DE UNA VACUNA CONTRA EL VIRUS H5N1

EN MICROALGAS USANDO UNA PLATAFORMA

INMUNOINFORMÁTICA ABIERTA

Dirección de Tesis



---

Director Dr. Juan Manuel Alcocer González

DERECHOS RESERVADOS© PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Juan Manuel Alcocer González, por su confianza prestada, su disposición y tiempo para aclarar todas y cada una de las dudas.

## **DEDICATORIAS**

A mi familia, compañeros y docentes que a lo largo de la trayectoria académica me han brindado su apoyo y amistad para lograr cada uno de los objetivos.

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	2
<b>DEDICATORIAS</b>	3
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	6
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	7
<b>LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS</b>	8
<b>RESUMEN EN ESPAÑOL</b>	9
<b>RESUMEN EN INGLÉS</b>	10
<b>1.0 INTRODUCCIÓN</b>	11
<b>2.0 ANTECEDENTES</b>	13
2.1 Virus de la Influenza Aviar	13
2.2 Taxonomía	13
2.3 Transmisión y enfermedad	14
2.4 Genoma	14
2.5 Vacunas	15
2.6 Bioinformática	15
2.7 Inmunoinformática	16
2.8 Predicción de modelos estructurales de proteínas	16
2.9 Predicción <i>ab initio</i>	17
3.0 Vacunología inversa	17
3.1 Vacunología inversa 2.0	18
<b>3.0 JUSTIFICACIÓN</b>	21
<b>4.0 HIPÓTESIS</b>	22
<b>5.0 OBJETIVO GENERAL</b>	22
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES	22
<b>6.0 MATERIAL Y MÉTODOS</b>	23
6.1 Obtención de la secuencia aminoacídica de la hemaglutinina y análisis estructural	23
6.2 Análisis de antigenicidad y alergenicidad	24
6.3 Predicción de epítomos de células B	24
6.4 Identificación de epítomos de células T	25
6.5 Predicción y validación de la estructura terciaria de la He	26
6.6 Interacción mediante acoplamiento molecular	26
6.7 Evaluación inmunológica	27
6.8 Diseño del gen sintético y clonación <i>in silico</i>	27

<b>7.0 RESULTADOS</b>	28
7.1 Análisis de las propiedades primarias de la He	28
7.2 Antigenicidad y alergenicidad	31
7.3 Predicción de epítomos de células Beta	33
7.4 Identificación de epítomos de células T	38
7.5 Validación del modelo de la estructura tridimensional de la He	46
7.6 Evaluación de la interacción mediante acoplamiento molecular	48
7.7 Simulación inmunológica	49
7.8 Identificación de epítomos discontinuos de células Beta	52
7.9 Diseño del gen sintético y clonación <i>in silico</i>	54
<b>8.0 DISCUSIÓN</b>	55
<b>9.0 CONCLUSIONES</b>	60
<b>10. PERSPECTIVAS</b>	60
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b>	61

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
1	Predicción de epítomos lineales inmunogénicos a partir de la secuencia aminoacídica de la hemaglutinina	33
2	Predicción de epítomos lineales antigénicos a partir de la secuencia aminoacídica de la hemaglutinina	35
3	Predicción de epítomos lineales accesibles a partir de la secuencia aminoacídica de la hemaglutinina	37
4	Epítomos de linfocitos T citotóxicos (CTL) predichos mediante el servidor NetMHCIIpan-4.3	38
5	Epítomos de linfocitos T auxiliares (HTL) seleccionados por el servidor NetMHC II pan	39
6	Epítomos discontinuos identificados en la estructura tridimensional de la He	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Número</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
1	Predicción de la estructura secundaria	28
2	Topología de la secuencia He	29
3	Identificación de dominios conservados	30
4	Predicción de puntos de incisión en la proteína	30
5	Predicción de mutabilidad relativa	31
6	Identificación antigenicidad	32
7	Análisis de alergenicidad	32
8	Identificación de epítomos inmunogénicos	34
9	Identificación de epítomos con giros beta	35
10	Identificación de epítomos antigénicos	36
11	Identificación de epítomos accesibles	37
12	Diagrama de Ramachandran plot	46
13	Análisis de la calidad del modelo estructural de la proteína He	47
14	Modelo refinado de la estructura tridimensional de la He	47
15	Predicción de la interacción molecular	48
16	Simulación inmune <i>in silico</i> tras la aplicación de la proteína He	51
17	Visualización de los epítomos discontinuos en la secuencia de la He	53
18	Adaptación de codones para <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .	54

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AIV	Virus de la Influenza Aviar
BLAST	Basic Local Aligment Search Tool
et al.	Et alii (y otros)
FDA	Food and Drug Administration
He	Hemaglutinina
IEDB	Immune Epitope Database
IIV	Vacunas de virus inactivados
NCBI	National Center for Biotechnology Information
pb	Pares de bases
PDB	Protein Data Bank
LAIV	Vacunas vivas atenuadas
OMS	Organización Mundial de la Salud

## RESUMEN

El virus de la influenza aviar A(H5N1) del clado 2.3.4.4b es catalogado de alta relevancia por considerarse de importante riesgo en la salud pública mundial debido a su alta patogenicidad, así como a su alta tasa de mortalidad principalmente en aves de corral generando importantes pérdidas en la industria avícola alrededor del mundo, asimismo llega a ser altamente mortal para aves silvestres, siendo una importante amenaza en la conservación de especies. Desde el 2021 se ha incrementado el número de casos a nivel mundial de los virus de la influenza aviar, especialmente el virus A(H5N1) del clado 2.3.4.4b, el cual ha generado importantes brotes de influenza en aves de corral y en aves silvestres en Asia, Oriente Medio, Europa, África y América del Norte ocasionado grandes pérdidas para el sector avícola y vulnerando la conservación de especies animales. El riesgo de transmisión humano-humano con este clado es latente y no se descarta la posibilidad, por tal motivo se considera como un problema de salud pública de suma importancia. Sin embargo, a pesar de su alta importancia para la salud animal, actualmente no existe un tratamiento o vacuna aprobada que confiera protección específica contra el virus A(H5N1) clado 2.3.4.4b basada en una plataforma microalgal. El uso de la bioinformática, así como el avance de las ciencias genómicas ha permitido dilucidar epítomos de células Beta y células T con la capacidad de inducir una respuesta inmunológica, sin la necesidad de cultivar el microorganismo patógeno en el laboratorio. El objetivo de esta investigación es analizar la inmunogenicidad de la proteína de cápside hemaglutinina (He) del virus A(H5N1) clado 2.3.4.4b mediante herramientas de la inmunoinformática para la identificación de epítomos candidatos a vacuna y su capacidad de inducir una respuesta inmunológica. Se realizará un análisis bioinformático para la identificación de epítomos candidatos a vacuna, asimismo se evaluarán las propiedades fisicoquímicas, así como la toxicidad, alergenidad y su similitud con proteínas de aves. Se realizará la predicción de las propiedades estructurales y de acoplamiento molecular. Finalmente, la secuencia nucleotídica se optimizará con los codones preferenciales de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* para la obtención de altos niveles de expresión de la proteína.

## ABSTRACT

The avian influenza virus A(H5N1) of clade 2.3.4.4b is classified as highly relevant due to its significant risk to global public health, attributed to its high pathogenicity and high mortality rate primarily in poultry, resulting in significant losses to the poultry industry worldwide. Additionally, it proves highly fatal to wild birds, posing a significant threat to species conservation. Since 2021, there has been an increase in the number of cases worldwide of avian influenza viruses, especially the A(H5N1) virus of clade 2.3.4.4b, which has caused significant outbreaks in poultry and wild birds in Asia, the Middle East, Europe, Africa, and North America, resulting in major losses for the poultry sector and jeopardizing species conservation efforts. The risk of human-to-human transmission with this clade is ongoing and cannot be ruled out, making it a matter of utmost public health concern. However, despite its high importance for animal health, there is currently no approved treatment or vaccine that provides specific protection against the A(H5N1) virus clade 2.3.4.4b based on a microalgal platform. The use of bioinformatics, along with advances in genomic sciences, has enabled the identification of epitopes of Beta cells and T cells capable of inducing an immune response, without the need to cultivate the pathogenic microorganism in the laboratory. The objective of this research is to analyze the immunogenicity of the hemagglutinin (He) capsid protein of the A(H5N1) virus clade 2.3.4.4b using immunoinformatics tools for the identification of vaccine candidate epitopes and their ability to induce an immune response. A bioinformatic analysis will be conducted to identify vaccine candidate epitopes, and physicochemical properties, as well as toxicity, allergenicity, and similarity to bird proteins, will be evaluated. Structural and molecular docking properties will be predicted. Finally, the nucleotide sequence will be optimized with the preferred codons of the microalga *Chlamydomonas reinhardtii* to achieve high levels of protein expression.

## 1.- INTRODUCCIÓN

La influenza aviar es una infección viral con la capacidad de infectar a una amplia variedad de animales entre los que destacan aves y humanos. En humanos la mayor parte de las infecciones causados por virus de influenza son del tipo A y tipo B. Mientras que en aves sólo ocurre la infección de influenza tipo A. Las distintas variantes de influenza reportadas actualmente se clasifican en Influenza Aviar de Alta Patogenicidad (HPAI, por siglas en inglés) e Influenza Aviar de Baja Patogenicidad (LPAI, por sus siglas en inglés). La Influenza Aviar de Alta Patogenicidad (HPAI) ha registrado un incremento en el número de casos de influenza en aves alrededor del mundo desde 2020-2021, infectando a un gran número de aves de corral y aves silvestres (Gomma et al. 2023). Los virus HPAI se caracterizan por causar severos síntomas y poseer una alta tasa de mortalidad en aves, generando por consecuencia grandes pérdidas económicas para la industria avícola a nivel mundial y vulnerando la conservación de aves silvestres. La Influenza aviar de alta patogenicidad (HPAI) subtipo H5N1 del clado 2.3.4.4b se ha vuelto relevante debido a su rápido esparcimiento alrededor del planeta ocasionado brotes de influenza sin precedentes a gran escala. En 1996 el virus H5N1 del tipo HPAI, fue identificado en aves silvestres en China y en 1997 se identificó por vez primera en humanos en Hong Kong (Cui et al. 2020; Lambert et al. 2022). Por consiguiente, entre los diversos subtipos existentes, específicamente el subtipo H5N1 se ha vuelto globalmente la variante predominante y de mayor relevancia, el cual ha ocasionado recientemente grandes brotes en Europa y América del Norte, generando importantes pérdidas a la industria avícola y en poblaciones de aves silvestres (Rehman et al. 2022). Así mismo, el clado 2.3.4.4b del virus A(H5N1) ha cruzado la barrera ave-mamífero ocasionando la infección tanto de humanos como de otros mamíferos carnívoros como lo son zorros, coyotes, así como mamíferos marinos entre los que destacan delfines y leones marinos (Tian et al. 2023). Los virus de la influenza pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*. Así mismo, poseen un genoma que comprende 13kb que expresa para 12 proteínas estructurales y no estructurales. En el proceso de infección y replicación celular el virus de la influenza posee una serie de pasos que le permite la reproducción e infección. Por su implicación en el proceso de infección viral destaca la

hemaglutinina (He), la cual es de suma importancia por su capacidad de anclarse a la célula huésped para su posterior ingreso y fusión con la membrana celular. Por tanto, la influenza aviar representa un gran reto para ser controlado a causa del gran número de brotes registrados recientemente y los impactos económicos negativos en la industria avícola a nivel mundial, así como el riesgo que representa para la conservación de la vida silvestre. Por su alta relevancia el subtipo A(H5N1) clado 2.3.4.4b representa un gran reto en salud pública a nivel mundial, a pesar de representar un grave problema a la salud, actualmente no se cuenta con un tratamiento efectivo o vacuna específica contra el clado 2.3.4.4b aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés) que permita ser administrado a partir de una plataforma de expresión basada en microalgas utilizando *Chlamydomonas reinhardtii*. Por tal motivo el desarrollo de una vacuna que confiera protección contra la infección vírica para aves es de suma importancia (Lim et al., 2024). La disponibilidad de los genomas de microorganismos de importancia médica, así como herramientas inmunoinformáticas ha permitido descubrir antígenos candidatos a vacuna de una forma más eficiente, surgiendo así un nuevo enfoque denominado vacunología inversa, el cual permite el desarrollo de vacunas de manera más rápida, con mayores probabilidades de éxito y a menor costo (Ponne et al, 2024). Así mismo, para la producción de proteínas recombinantes las microalgas son un eficiente sistema de expresión, particularmente por su capacidad de producir un gran número de compuestos de interés terapéutico, aunado a sus altos niveles de expresión, alta estabilidad genética, facilidad de preservación, seguridad, escalabilidad y bajo costo (Specht y Mayfield 2014). Actualmente, se encuentran en desarrollo y en diversas etapas de ensayo clínico vacunas basadas en la expresión de antígenos en diversas especies de microalgas, entre las que destaca la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* evidenciando la viabilidad para ser utilizada como plataforma para la expresión de antígenos con capacidad de inducir una respuesta inmunológica efectiva (Kurup y Thomas, 2020). Los análisis desarrollados mediante herramientas bioinformáticas en este trabajo evidenciaron el potencial de la proteína de cápside la hemaglutinina del subtipo A(H5N1) clado 2.3.4.4b para ser utilizada como una vacuna por su capacidad de estimular una respuesta inmunológica y con el potencial de conferir protección contra la influenza aviar.

## 2.- ANTECEDENTES

### 2.1 Virus de la Influenza Aviar

El virus de la influenza aviar (AIV, por sus siglas en inglés), representa uno de los retos más importantes de salud relacionados a la producción avícola con importantes consecuencias económicas negativas a nivel mundial. Los subtipos H5, H7 y H9 han sido clasificados con la capacidad de cruzar la barrera de especie. Los virus de la influenza aviar altamente patogénica (HPAI, por sus siglas en inglés) comprenden los subtipos H5 y H7 con una tasa de mortalidad de hasta el 100%. Mientras que los virus de baja patogenicidad (LPAIV, por sus siglas en inglés) se caracterizan por generar síntomas de baja severidad. La influenza aviar A(H5N1) posee gran relevancia por causar múltiples brotes a nivel mundial generando importantes pérdidas económicas, así como su capacidad de cruzar la barrera ave-mamífero. Desde el 2003 hasta el 2023 se ha registrado en un total de 21 países y 868 casos de infecciones en humanos específicamente por la influenza aviar subtipo A(H5N1) de los cuales 457 fueron fatales. Ante el incremento de casos de diversas variantes a nivel mundial la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha desarrollado estrategias basadas en vacunas y fármacos específicos para disminuir y prevenir casos severos. Actualmente, la vacunación es considerada una de las formas más efectivas para el control de la enfermedad (Imperia et al. 2023; Krammer y Cherry 2023).

### 2.2 Taxonomía

El virus de la influenza aviar pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*. Actualmente, se clasifican tres tipos de influenza aviar: A, B y C. Los tipos A y B son los responsables de brotes anuales de influenza ocasionando síntomas de moderado a severo, mientras que la influenza tipo C, causa síntomas ligeros. Los virus de la influenza tipo A, se clasifican con base a su combinación en las glicoproteínas de superficie (HA y NA), el cual comprende un total de 18 tipos de Hemaglutininas y 11 tipos de Neuraminidasas. Existen 16 subtipos de HA, las cuales han sido clasificadas en dos grupos distintos y cuatro clados (Peiris et al 2004). El grupo uno al cual pertenece el clado H1; integra H1, H2, H5, H6, H11, H13 y H16, mientras que el clado H9 integra la H8, H9 y H12, así

mismo, el grupo dos, incluye el clado H3 el cual comprende la H3, H4 y H14, así como el clado H7 el cual integra el H7, H10 y H15. Mientras que los subtipos de la proteína Neuraminidasa se encuentran divididos en tres grupos distintos, siendo el grupo uno el cual comprende la N1, N4, N5 y N8, el grupo dos comprende la N2, N3, N6, N7 y la N9, asimismo el grupo tres integra además la Neuraminidasa de los virus de influenza B, los cuales comprende la N10 y N11 (Tong et al. 2012).

### **2.3 Transmisión y enfermedad**

Las proteínas Hemaglutinina y Neuraminidasa en los virus de la influenza A poseen una relevante función con la patogenicidad. La Hemaglutinina se une a las células mediante los residuos terminales de ácido siálico de las glicoproteínas con el cual da inicio al ciclo de infección. Así mismo, la Neuraminidasa libera los viriones para terminar el ciclo infeccioso a partir de la incisión de los ácidos siálicos terminales. El mecanismo de transmisión a humanos se presenta directamente por aves infectadas y con una mayor probabilidad de ocurrir en sitios de alta producción avícola en la que se carezcan medidas de seguridad personal. La incubación del virus en el cuerpo se estima en un tiempo aproximado de hasta 7 días, en el que pueden presentarse algunos síntomas como problemas gastrointestinales y problemas en el sistema nervioso central en el que pueden agravarse los síntomas llegando a ocasionar la muerte (Dey et al. 2023).

### **2.4 Genoma**

El genoma del virus de la influenza aviar tipo A es de ARN monocatenario de sentido negativo, comprende un tamaño de 13kb y codifica para un total de 12 proteínas siendo 5 proteínas estructurales de superficie; hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), proteína de matriz M1 (M1), proteína del canal iónico M2 (M2) y proteína de la nucleocápside (NP) así como 8 proteínas no estructurales; NS1, NS2 y el complejo de la ARN polimerasa el cual comprende las proteínas PB1, PB2, PA, PB1-F2 y PA-X. Así mismo, el virus de la influenza aviar es un virus envuelto con un tamaño que oscila entre 80 a 120 nm (Charostad et al. 2023).

## **2.5 Vacunas**

El diseño de vacunas contra la influenza aviar representa un importante reto debido a la complejidad de dilucidar el subtipo de influenza que será la responsable de causar una próxima pandemia. Así mismo, los subtipos H5 y H7 se encuentran siempre latentes como posibles causantes de una pandemia. Los métodos tradicionales como vacunas vivas atenuadas (LAIV, por sus siglas en inglés) y vacunas de virus inactivados (IIV, por sus siglas en inglés) presenta importantes limitantes como baja inmunogenicidad, requerimiento de un mayor número de dosis, alta dependencia de embriones de huevos, además de un proceso lento para su producción, generando importantes limitaciones para suplir una demanda derivado de un brote de influenza. Hasta el año 2023, el progreso en disciplinas como virología, biología molecular, bioinformática e inmunología ha permitido el desarrollo de siete vacunas contra el virus A(H5N1) basado en distintos tipos de plataformas entre las que se encuentra la vacuna inactivada: H5-Re13, H5-Re-14, H7-Re-4, vacuna trivalente inactivada: Fludax®, vacuna inactivada: AS03-adjuvanted prepandemic H5N1, vacuna de virus atenuada: H5N1 pandemic live-attenuated, vacuna basada en vector: Newcastle Disease Virus H5, vacuna monovalente inactivada de la empresa Sanofi Pasteur, Inc. y la vacuna viva atenuada de la empresa Astrazeneca (Dey et al. 2023).

## **2.6 Bioinformática**

La bioinformática surge de la convergencia entre las tecnologías de la información y las ciencias computacionales. La aplicación de tecnología en la investigación biológica ha conducido a estrategias avanzadas para la gestión de datos y análisis más efectivos. Esta disciplina cobró relevancia en los años noventa, especialmente con el auge de proyectos de secuenciación como el del genoma humano, marcando su consolidación como un campo de investigación distintivo. Su evolución ha desempeñado un papel crucial en el descubrimiento de relaciones entre mutaciones, cambios en funciones biológicas y la evolución de diversos organismos, enriqueciendo disciplinas como la genómica, proteómica y filogenética. Además, la bioinformática facilita la comparación y análisis eficiente de diversas categorías de datos biológicos, ofreciendo resultados rápidos, a bajo coste y fiables (Oli et al. 2020).

## **2.7 Inmunoinformática**

La inmunoinformática es un campo interdisciplinario que combina la inmunología con la bioinformática y la informática. Su objetivo principal es comprender y analizar el sistema inmunológico utilizando herramientas computacionales y técnicas de procesamiento de datos. Este campo se ha vuelto cada vez más relevante con los avances en la genómica y la proteómica, ya que permite estudiar en detalle cómo el sistema inmunológico reconoce y responde a los antígenos. La inmunoinformática utiliza diversas técnicas computacionales para analizar datos biológicos relacionados con el sistema inmunológico. Esto puede incluir el análisis de secuencias genéticas y proteicas para identificar epítomos (Nielsen et al. 2020). También puede implicar el modelado y la simulación de interacciones entre moléculas inmunológicas, como anticuerpos y receptores de células T, para comprender mejor cómo se desencadena la respuesta inmune.

## **2.8 Predicción de modelos estructurales de proteínas**

El modelado por homología se basa en la predicción de una estructura tridimensional desconocida utilizando la información de una proteína conocida como plantilla, de la cual se parte para generar una estructura tridimensional similar, aunque no idéntica (Floudas et al. 2006). Este método consta de una selección de plantillas de la proteína, posteriormente un alineamiento con la secuencia objetivo y finalmente un refinamiento para mejorar la baja similitud. Para evaluar la precisión de las predicciones de nuevas proteínas, existen rangos definidos. Si el alineamiento entre la secuencia objetivo y la plantilla es superior al 30%, aproximadamente el 90% de los modelos predichos serán precisos. Sin embargo, si el alineamiento es menor al 20%, solo alrededor del 10% de las estructuras serán precisas. La región entre el 20% y el 30% se considera una zona de incertidumbre (Torrise et al. 2020).

## **2.9 Predicción *ab initio***

La predicción *ab initio* consiste en determinar la estructura tridimensional más estable de una proteína utilizando un programa computacional a partir de su secuencia aminoacídica lineal, buscando la conformación de menor energía. Este enfoque tiene una gran relevancia en disciplinas como la proteómica, ya que permite prever la estructura de las proteínas y, basándose en principios fisicoquímicos, simular el plegamiento de estas estructuras. Sin embargo, en la actualidad, la precisión de la predicción *ab initio* es limitada y su éxito se restringe principalmente a proteínas pequeñas (Hardin et al. 2002).

## **3.0 Vacunología inversa**

La disponibilidad de los genomas de numerosos microorganismos de importancia médica ha facilitado la identificación de nuevos antígenos que no se habían podido descubrir mediante técnicas convencionales, lo que ha dado lugar a un nuevo enfoque en el desarrollo de vacunas conocido como vacunología inversa. Este enfoque se basa en el análisis de las secuencias genómicas utilizando herramientas bioinformáticas para identificar los antígenos más probables para inducir una respuesta inmunitaria. Las proteínas candidatas se eligen en función de la predicción de su función, como la accesibilidad y la secreción, para luego ser clonadas, expresadas y analizadas con el fin de confirmar su localización celular *in vitro* y, mediante modelos animales, evaluar su inmunogenicidad y capacidad protectora (Criado et al. 2008). La aplicación de la bioinformática a través del enfoque de vacunología inversa permitió por primera vez el desarrollo de una vacuna contra el serogrupo B de *Neisseria meningitidis* (MenB) a partir de la identificación de epítomos mediante el análisis de la secuencia genómica. Además, el desarrollo de vacunas mediante vacunología inversa ha tenido éxito contra otros microorganismos patógenos, incluyendo *Bacillus anthracis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Helicobacter pylori* y *Mycobacterium tuberculosis* (He et al. 2010).

### **3.1 Vacunología inversa 2.0**

La vacunología inversa 2.0 representa una evolución del enfoque original de la vacunología inversa, centrándose en la identificación y diseño de vacunas mediante el uso de técnicas avanzadas de bioinformática y biología computacional. Este enfoque ampliado se fundamenta en una exploración exhaustiva de datos genómicos, proteómicos y de expresión para identificar antígenos candidatos capaces de inducir una respuesta inmune protectora contra patógenos específicos. A diferencia de la vacunología tradicional, que a menudo se basa en el cultivo y la caracterización de microorganismos, la vacunología inversa 2.0 aprovecha las capacidades de secuenciación de alto rendimiento y análisis bioinformáticos para analizar grandes conjuntos de datos genómicos y proteómicos de los patógenos. Estos datos se utilizan para predecir y seleccionar proteínas específicas del patógeno que podrían ser candidatas a vacunas, considerando criterios como su localización en la membrana celular, su antigenicidad y su capacidad para inducir respuestas inmunes protectoras. Una vez identificados los antígenos candidatos, la vacunología inversa 2.0 implica el diseño y la síntesis de vacunas mediante el uso de técnicas de biología molecular y bioinformática estructural para optimizar la presentación de los antígenos y mejorar su inmunogenicidad. Esto puede implicar el uso de sistemas de expresión heteróloga para producir proteínas recombinantes o la ingeniería de vacunas basadas en ácidos nucleicos. (Rappuoli et al. 2016). La vacunología inversa 2.0 ofrece varias ventajas sobre los enfoques tradicionales de desarrollo de vacunas, incluyendo una mayor rapidez y eficiencia en la identificación de antígenos candidatos, así como la capacidad de diseñar vacunas personalizadas y adaptadas a las características específicas del patógeno y del huésped. Esta estrategia innovadora ha demostrado su utilidad en el desarrollo de vacunas contra una amplia gama de patógenos, desde bacterias hasta virus, y tiene el potencial de revolucionar el campo de la inmunización (Burton 2017).

### **3.2 Epítomos candidatos a vacuna**

La inmunogenicidad se refiere a la capacidad de provocar una respuesta inmunitaria, ya sea humoral o mediada por células. Una sustancia que desencadena una respuesta inmunitaria específica se conoce como inmunógeno. Por otro lado, la antigenicidad se define como la capacidad de unirse de manera específica a los productos finales de la respuesta inmunitaria, como los anticuerpos secretados y los receptores de superficie de las células T. Es importante destacar que las moléculas que poseen inmunogenicidad también tienen antigenicidad, aunque no siempre ocurre lo contrario. Algunas moléculas pequeñas, conocidas como haptenos, pueden ser antigénicas, pero carecen de la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria específica por sí mismas, es decir, no tienen inmunogenicidad. En los esfuerzos para desarrollar vacunas o péptidos sintéticos, es esencial analizar la secuencia de aminoácidos de un antígeno proteico para identificar los péptidos hidrófobos. Los epítomos reconocidos por las células T generalmente consisten en péptidos internos, que en su mayoría son residuos hidrofílicos. Por lo tanto, es más probable que los péptidos hidrófobos sintéticos representen epítomos de células T, mientras que los péptidos hidrófilos sintéticos representan epítomos accesibles para las células B, lo que da lugar a una respuesta basada en anticuerpos (Sette y Fikes, 2003).

### **3.3 Microalgas como sistemas de expresión**

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos, las cuales se clasifican en procariontas y eucariontas. Las microalgas poseen una alta capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales, así como la capacidad metabólica de expresar distintos compuestos como proteínas, lípidos, carbohidratos y vitaminas. Recientemente las microalgas han retomado relevancia por sus aplicaciones en el área farmacéutica y terapéutica por su capacidad de expresar de manera exitosa vacunas y anticuerpos monoclonales. Así mismo, la producción de proteínas recombinantes basada en microalgas evidencia un eficiente sistema de expresión, particularmente por su capacidad de producir un gran número de compuestos de interés terapéutico, aunado a sus altos niveles de expresión, alta estabilidad genética, facilidad de preservación, seguridad, escalabilidad y bajo costo (Vega et al. 2021).

La microalga *Chlamydomonas reinhardtii* es considerado un modelo en biotecnología para la expresión de distintos compuestos de interés terapéutico, entre los que se encuentra la expresión de anticuerpos, vacunas y proteínas virales. Actualmente, se encuentran en desarrollo y en diversas etapas de ensayo clínico vacunas contra virus de importancia en salud humana, basadas en la expresión de antígenos en diversas especies de microalgas, entre las que destaca la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* evidenciando la capacidad de expresar compuestos de interés terapéutico. (Yan et al, 2016).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El virus de la influenza aviar A(H5N1) clado 2.3.4.4b es de suma relevancia por su capacidad de ocasionar importantes afectaciones en aves domésticas y silvestres, así como un potencial riesgo para la salud humana. El virus A(H5N1) clado 2.3.4.4b es responsable de ocasionar importantes pérdidas económicas a nivel mundial en el sector avícola debido a su fácil diseminación y alta tasa de mortalidad entre aves domésticas y aves silvestres. Así mismo, representa un alto riesgo de salud dada su capacidad de cruzar la barrera ave-mamífero, lo cual pone en riesgo la salud de una amplia variedad de animales incluidos los humanos. A pesar de las diversas medidas de control, así como de los esfuerzos para el desarrollo de tratamientos y vacunas para el control de los brotes de influenza en diversas regiones del mundo no existe una vacuna específica que brinde protección contra el virus A(H5N1) clado 2.3.4.4b basada en una plataforma de expresión microalgal. Por tanto, es de suma importancia el desarrollo de una vacuna que confiera protección y permita un mayor control sobre los brotes de influenza específicamente contra este clado.

## **4.- HIPÓTESIS**

La hemaglutinina del subtipo H5N1 clado 2.3.4.4b posee la capacidad de inducir una respuesta inmunológica.

## **5. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la capacidad de la hemaglutinina del subtipo H5N1 clado 2.3.4.4b para activar una respuesta inmunológica mediante el uso de diversas herramientas bioinformáticas.

### **5.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

- 5.1.2** Analizar la secuencia aminoacídica de la hemaglutinina para predecir sus propiedades fisicoquímicas y alergenicidad.
- 5.1.3** Identificar mediante herramientas inmunoinformáticas del IEDB epítomos de células B y células T con características de vacuna.
- 5.1.4** Determinar la estructura secundaria y terciaria de la hemaglutinina mediante el servidor Phyre<sup>2</sup>.
- 5.1.5** Predecir mediante acoplamiento molecular la capacidad de interacción de la He con la proteína ChTLR4.
- 5.1.6** Evaluar la capacidad *in silico* de activación del sistema inmunológico mediante el servidor C-ImmSim.
- 5.1.7** Optimizar la secuencia de la He para ser expresada en una plataforma basada en microalgas.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Obtención de la secuencia aminoacídica de la hemaglutinina y análisis estructural

La secuencia aminoacídica de la hemaglutinina (He) de la influenza aviar de alta patogenicidad A(H5N1) del clado 2.3.4.4b fue obtenida desde la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) con el número de acceso: WHA27223.1. Se evaluó mediante el servidor ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) las propiedades fisicoquímicas entre las que se incluyen el peso molecular, punto isoeléctrico, vida media, índice de estabilidad e hidropaticidad (GRAVY). La predicción de la estructura secundaria a partir de la secuencia aminoacídica de la hemaglutinina del clado 2.3.4.4b se realizó mediante el servidor SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)). La evaluación de la presencia de puentes disulfuro en la secuencia, así como la solubilidad fueron evaluados mediante las herramientas bioinformáticas de Dipro del servidor SCRATCH Protein Predictor (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>) y Protein-Sol (<https://protein-sol.manchester.ac.uk/>), respectivamente. La topología de la hemaglutinina se predijo utilizando el servidor TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). La predicción de la vía de expresión y localización subcelular de la He en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* (eucariota) se realizó mediante los servidores SLP-Local (<https://sunflower.kuicr.kyoto-u.ac.jp/~smatsuda/slplocal.html>) y Predictprotein (<https://predictprotein.org/home>). Adicionalmente, se realizó la evaluación de los dominios conservados en la secuencia de la hemaglutinina mediante los servidores

Conserved Domain (CDD) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) y PFAM (<https://pfam.xfam.org/>). Se evaluó la presencia de péptidos señal, así como sus sitios de escisión mediante el servidor SignalP (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>). Así mismo, se evaluó la mutabilidad relativa de la secuencia aminoacídica mediante el servidor de ProtScale de ExPASy (<https://web.expasy.org/protscale/>).

## **6.2 Análisis de antigenicidad y alergenicidad**

La antigenicidad de la proteína He se evaluó mediante el servidor VaxiJen v2.0 (<http://www.jenner.ac.uk/VaxiJen>) con un valor de umbral de 0.4. La alergenicidad de la He se determinó mediante los servidores AllerTop v.2.0 (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/>) y AllergenFP v.1.0 (<http://ddgpharmfac.net/AllergenFP/index.html>). La herramienta de BLAST-P (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) fue utilizada para la predicción de similitud entre la secuencia aminoacídica de la He contra secuencias aminoacídicas en aves.

## **6.3 Predicción de epítomos de células B**

Mediante las herramientas de la Base de Datos Epítomo Inmune (IEDB, por sus siglas en inglés) se evaluó la presencia de epítomos de células B (<https://www.iedb.org/>). Se utilizó el modelo hidden Markov utilizando un umbral de 0.50, para la predicción de epítomos lineales con características de inmunogenicidad se empleó la herramienta Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0. La predicción de giros beta se realizó con el

modelo de Chou y Fasman con un umbral de 1.0. El modelo Kolaskar y Tongaonkar fue utilizado para la predicción de epítomos con la característica de antigenicidad utilizando un umbral de 1.0. Además, el modelo Emini fue utilizado para la predicción de accesibilidad de superficie mediante un umbral de 1.0.

#### **6.4 Identificación de epítomos de células T**

En la identificación de epítomos de células T para aves se utilizaron los alelos humanos del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHCI) y clase II (MHCII). La secuencia aminoacídica de la He fue utilizada para la identificación de epítomos MHC-I mediante el servidor NetMHCcons 1.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetMHCcons-1.1/>) se utilizaron los alelos humanos más apropiados para aves los cuales para este estudio fueron: HLA-B 40:06, HLA-B 41:04, y HLA-B 41:03. La longitud del epítomo fue fijada en 9 aminoácidos. La predicción de los epítomos se estableció con un valor para IC50 de 50 nM (unión fuerte) y un valor de 500nM (unión débil). Así mismo, el porcentaje de rango para uniones fuertes se fijó en 0.5 y para uniones débiles se estableció en 2. Los alelos humanos MHC clase II: DRB1:1482, DRB1:1366, DRB1:1310 y DRB1:1445, fueron utilizados por su capacidad de inducir una respuesta inmunológica en aves, asimismo para la identificación de epítomos MHC-II se utilizó el servidor NetMHCIIpan-4.3 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetMHCIIpan-4.3/>). La longitud de los aminoácidos se fijó en 15. Mientras que el valor de rango de percentiles para uniones fuertes a epítomos fue fijado en 0.5 y para uniones débiles se fijó en 2.

## **6.5 Predicción y validación de la estructura terciaria de la He**

Se realizó la predicción la estructura tridimensional a partir de la secuencia aminoacídica de la He mediante el servidor Phyre<sup>2</sup> (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). El refinamiento del modelo estructural se realizó mediante el servidor GalaxyRefine (<https://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=REFINE>). Adicionalmente, se realizó la validación del modelo refinado de la estructura tridimensional de la He, mediante el diagrama de Ramachandran utilizando el servidor PROCHECK (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/>) y el servidor ProSA-web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>). Además, se realizó el cálculo del análisis de minimización de energía del modelo estructural utilizando el programa Swiss-Pdb Viewer. La estabilidad del modelo refinado de la He se evaluó mediante el servidor MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>). Se utilizó el software de UCSF Chimera ([www.cgl.ucsf.edu](http://www.cgl.ucsf.edu)) para visualizar el modelo de la He.

## **6.6 Interacción mediante acoplamiento molecular**

Se evaluó la interacción entre el modelo refinado de la estructura tridimensional de la HE y el receptor inmune de ave (ChTLR4). La estructura tridimensional de la ChTLR4 se extrajo del Banco de Datos de Proteínas (PDB, por sus siglas en inglés) con el número de acceso: 3MU3. Se realizó la depuración de la estructura tridimensional de la proteína ChTLR4 mediante el software de UCSF Chimera ([www.cgl.ucsf.edu](http://www.cgl.ucsf.edu)). Mediante el servidor HDOCK (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>) se realizó la simulación de interacción proteína-proteína basado en un modelo de algoritmo híbrido el cual integra modelos y

acoplamiento *ab initio*. La visualización del complejo se realizó mediante el software de UCSF Chimera ([www.cgl.ucsf.edu](http://www.cgl.ucsf.edu)).

### **6.7 Evaluación inmunológica**

Mediante el servidor CIMMSIM (<http://150.146.2.1/C-IMMSIM/index>) se realizó la simulación de la respuesta inmunológica ante la administración de la proteína He como vacuna. La simulación se ajustó para ser aplicado para un total de 1,100 ciclos con una equivalencia para cada ciclo de 8 horas. Se configuró para la aplicación de tres inyecciones en el día 1, 84 y 168, los demás parámetros se dejaron preestablecidos. Adicionalmente, se utilizó el servidor ElliPro del IEDB (<http://tools.iedb.org/ellipro/>) para la identificación de epítomos de células B discontinuos en la estructura tridimensional de la proteína He, los parámetros del servidor se dejaron preestablecidos.

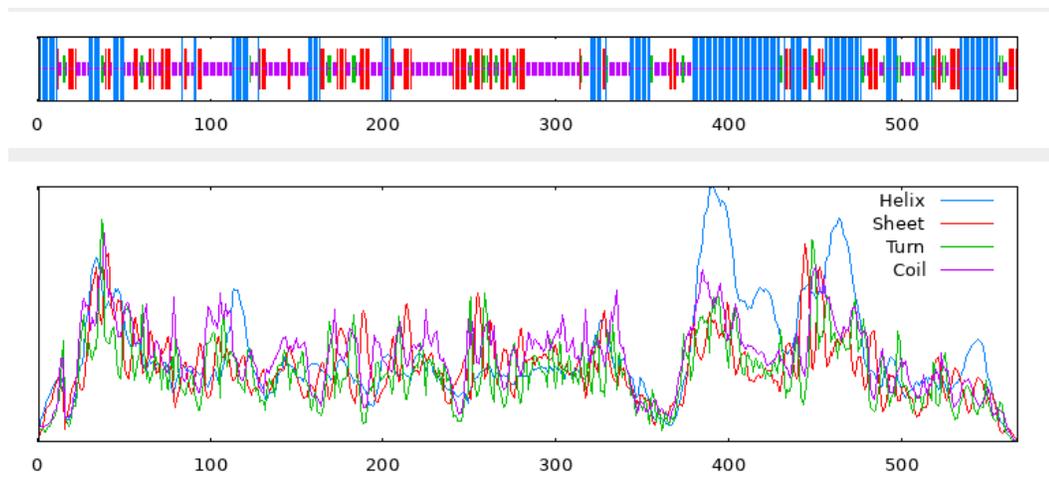
### **6.8 Diseño del gen sintético y clonación *in silico***

Se diseñó el gen sintético he que codifica para la proteína He de la A(H5N1) clado 2.3.4.4b y la secuencia nucleotídica se optimizó con los codones preferenciales de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, utilizando el programa GenSmart™ Codon Optimization Tool (<https://www.genscript.com/tools/gensmart-codon-optimization>). La secuencia optimizada del gen he se clonó *in silico* en el vector de expresión Algevir entre los sitios de restricción *SmaI* 5' y *BamHI* 3', río abajo del promotor AlcA y con el terminador 35S.

## 7.0 RESULTADOS

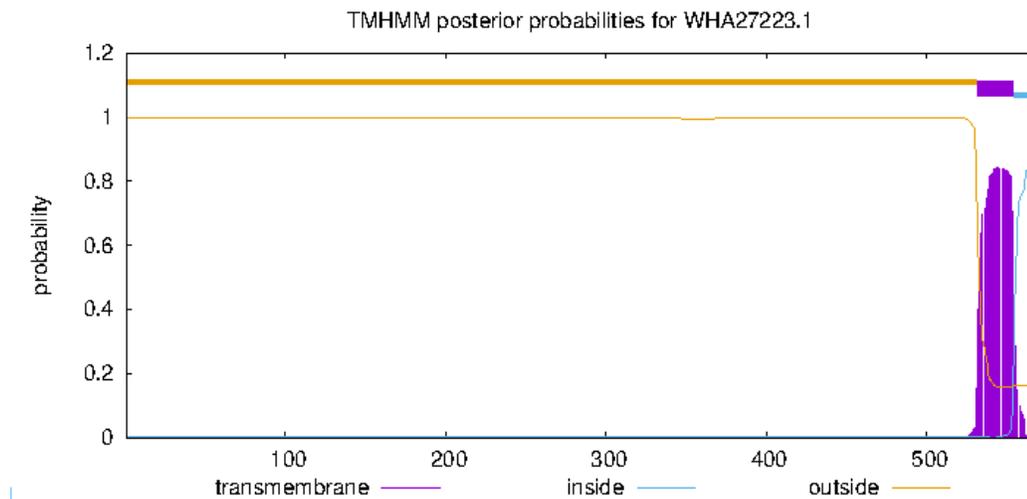
### 7.1 Análisis de las propiedades primarias de la He

El análisis de las propiedades fisicoquímicas de la He comprendió un total de 567 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 64080.34 Da y un punto isoeléctrico de 6.48. La vida media estimada de la He fue de 30 horas en reticulocitos de mamíferos, 20 minutos en levadura y 10 horas en *Escherichia coli*. El índice de inestabilidad (II) fue de 36.15. Así mismo, se evidenció termo estabilidad en la He con un índice alifático de 83.40, mientras que el índice GRAVY resultó en -0.293. En la Figura 1 se muestra la estructura secundaria de la He mediante el servidor SOPMA el cual evidenció un 33.69% hélices alfa, 20.11% hebras extendidas, 7.58% giros beta y con un 38.62% giros aleatorios.



**Figura 1. Predicción de la estructura secundaria.** En el diagrama se evidencia el porcentaje, tipo y localización de las conformaciones estructurales secundarias de la He.

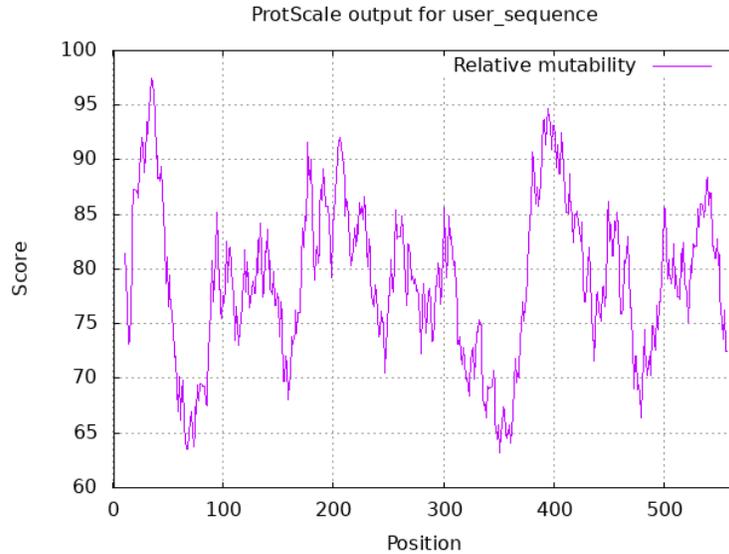
La secuencia de la He evidenció mediante el servidor SCRATCH Protein Predictor un total de 6 puentes disulfuro (S-S). Así mismo, el servidor Protein-Sol generó un valor de solubilidad de 0.2. La predicción de la topología de la proteína He mediante el servidor TMHMM evidenció que los residuos del 1 al 531 se encuentran expuestos y los residuos 555 al 567 se encuentran al interior de la estructura de la proteína (Figura 2).



**Figura 2. Topología de la secuencia He.** Se muestran las secciones expuestas de la secuencia aminoacídica de la he.

La predicción mediante el servidor SLP-Local para la vía de expresión y localización subcelular de la He evidenció un SVM score de 0.9 para la vía secretora. Los resultados fueron confirmados por el servidor Predictprotein, confirmando la vía de secreción de la He hacia el exterior de la célula eucariota. En la Figura 3 se muestra la identificación del dominio conservado Hemaglutinina (pfam00509) a partir de la secuencia aminoacídica de la He del subtipo A(H5N1) clado 2.3.4.4b mediante el servidor Conserved Domain





**Figura 5. Predicción de mutabilidad relativa.** En el gráfico se evidencia las regiones de la secuencia que presentan mayor grado de mutabilidad.

## 7.2 Antigenicidad y alergenicidad

El resultado mediante el servidor VaxiJen v2.0 de la proteína He evidenció un valor de 0.5424, el cual es considerado como antígeno probable (Figura 6). El análisis de alergenicidad por los servidores AllerTop v.2.0 y AllergenFP v.1.0 clasificaron a la He como no alérgica (Figura 7), lo cual indica que es poco probable que la He induzca alergia al ser administrada. La herramienta BLAST-P no encontró similitud entre la secuencia de la He y secuencias de proteínas en aves.

**Model selected: virus**

**Threshold for this model: 0.4**

**Your Sequence:**

```

MENIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQ
VDTIMEKNVTVTHAQDILEKTHNGKLCDLNG
VKPLILKDCSVAGWLLGNPMCDFIRVPEWS
YIVERANPANDLCYPGSLNDYEELKHMLSRI
NHFEKILIIPKSSWPNHETSLGVSAACPQQG
APSPFRNVVWLIKKNDAYPTIKISYNNNTRE
DLLILWGIHHSNNAEEQTNLYKNPTTYISVG
TSTLNQRLAPKIATRSQVNGQGRMDFFWTI
LKPDDAIHFESNGNFIAPYAYKIVKKG DST
IMKSGVEYGH CNTKQTPVGAINSSMPFHNI
HPLTIGECPKYVKS NKLVLATGLRNSPLREK
RRKRGLFGA IAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHS
NEQSGYAADKESTQK AIDGVTNKVNSIIDK
MNTQFEAVGREFNNLERRIENLNK KMEDGFL
DVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYD
KVRQLRDN AKELGNGCFEFYHKCDNECMES
VRNGTYDYPQYSEEARLKREEISGVKLESVG
TYQILSIYSTAASSLALAIMMAGLSLWMC SN
GSLQCRICI

```

Overall Prediction for the Protective Antigen = 0.5424 ( Probable **ANTIGEN** ).

**Figura 6. Identificación antigenicidad.** La secuencia aminoacídica de la He fue clasificada como probable antígeno.

**AllerTOP v. 2.0**

Bioinformatics tool for allergenicity prediction

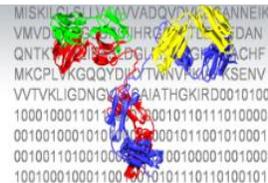
**Your sequence is:**

**PROBABLE NON-ALLERGEN**

The nearest protein is:

[UniProtKB accession number Q9H799](#)

defined as non-allergen



```

MISKILNLSLVAVVADQVDA...ANNEIK
VMVD...HRG...TL...SDAN
QNTK...DGL...G...ACHF
MKCPLVGGQYD...TVV...K...KSENV
VTVKLI GDNGY...GAIATHGKIRD001000
100010001101...0010110111010000
00100100010100...0001011001010001
00100110100100...00100001001000
100100010001100...0010110110100101

```

**Figura 7. Análisis de alergenicidad.** El servidor AllerTOP v.2.0 clasificó a la proteína como probable no alérgeno.

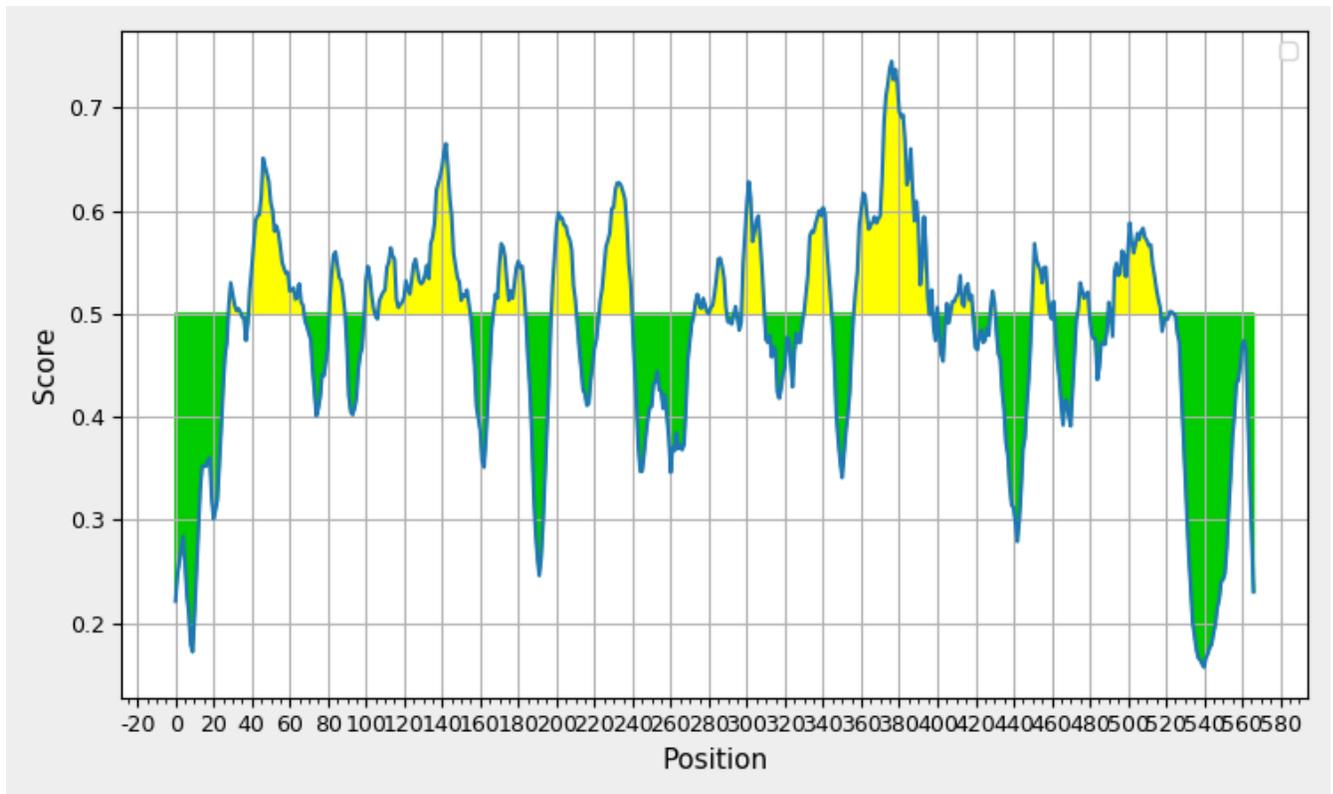
### 7.3 Predicción de epítomos de células Beta

En la tabla 1 se muestran los resultados de la predicción de epítomos con características de inmunogenicidad, asimismo en la Figura 8 se presenta el gráfico de inmunogenicidad a partir del modelo de hidden Markov. Además, en la Figura 9, se ejemplifica el gráfico para la predicción de giros beta mediante el modelo Chou y Fasman. Así mismo, en la Tabla 2 se muestran los epítomos identificados mediante el modelo Kolaskar y Tongaonkar con características de antigenicidad, mientras que en la Figura 10, se evidencia el gráfico de los epítomos en la secuencia con las características antigénicas. En la Tabla 3, así como en la Figura 11 se muestran los epítomos identificados con la característica de accesibilidad mediante el modelo de Emini.

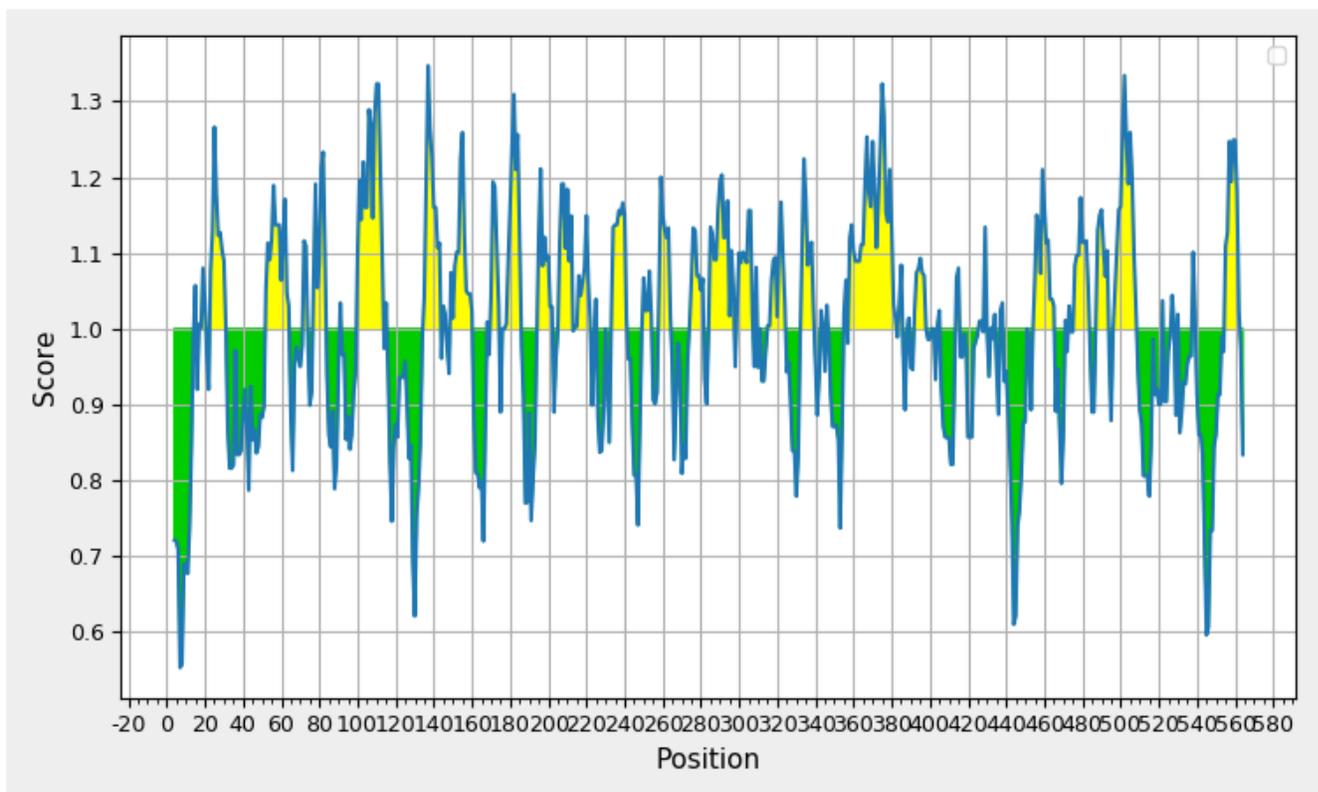
**Tabla 1.** Predicción de epítomos lineales inmunogénicos a partir de la secuencia aminoacídica de la hemaglutinina.

No.	Inicio	Fin	Epítomos	Longitud
1	29	35	TEQVDTI	7
2	40	68	VTVTHAQDILEKTHNGKLCDLNGVKPLIL	29
3	82	90	MCDEFIRVP	9
4	101	105	PANDL	5
5	108	155	PGSLNDYEELKHMLSRLNHFEKILIIIPKSSWPNHE TSLGVSAACPYQG	48
6	168	184	KKNDAYPTIKISYNNNTN	17
7	199	211	NAEEQTNLYKNPT	13
8	224	240	RLAPKIATRSQVNGQRG	17
9	274	290	KKGDSTIMKSGVEYGHC	17
10	295	295	Q	1
11	299	310	GAINSSMPFHNI	12
12	331	345	TGLRNSPLREKRRKR	15
13	358	396	GWQGMVDGWYGYHHSNEQGSGYAADKESTQK AIDGVTNK	39
14	398	398	N	1
15	401	401	I	1
16	406	406	T	1
17	408	419	FEAVGREFNNLE	12
18	429	431	MED	3

19	451	459	RTLDFHDSN	9
20	462	462	N	1
21	475	480	AKELGN	6
22	491	491	N	1
23	494	518	MESVRNGTYDYPQYSEEARLKREEI	25
24	523	524	LE	2



**Figura 8. Identificación de epítomos inmunogénicos.**

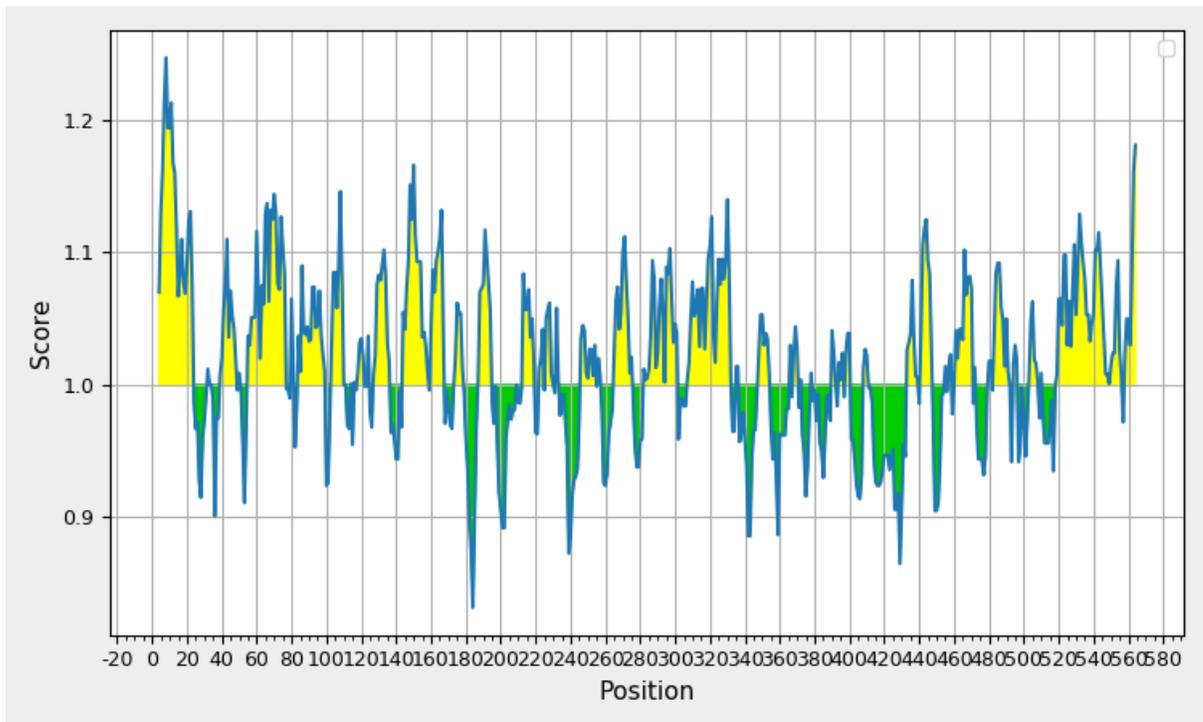


**Figura 9. Identificación de epítomos con giros beta.**

**Tabla 2.** Predicción de epítomos lineales antigénicos a partir de la secuencia aminoacídica de la hemaglutinina.

No.	Inicio	Fin	Epítomos	Longitud
1	4	23	IVLLLAIVSLVKSDQICIGY	20
2	39	48	NVTVTHAQDI	10
3	55	76	GKLCDLNGVKPLILKDCSVAGW	22
4	84	99	DEFIRVPEWSYIVERA	16
5	103	111	NDLCYPGSL	9
6	127	136	FEKILIIPKS	10
7	144	158	SLGVSAACPYQGAPS	15
8	160	167	FRNVVWLI	8
9	187	194	DLLILWGI	8
10	213	219	YISVGTS	7
11	246	254	WTILKPDDA	9
12	265	275	APEYAYKIVKK	11
13	282	301	KSGVEYGHCNTKCQTPVGAI	20
14	307	331	FHNIHPLTIGCEPKYVKSNNKLVLAT	25
15	348	354	FGAIAGF	7

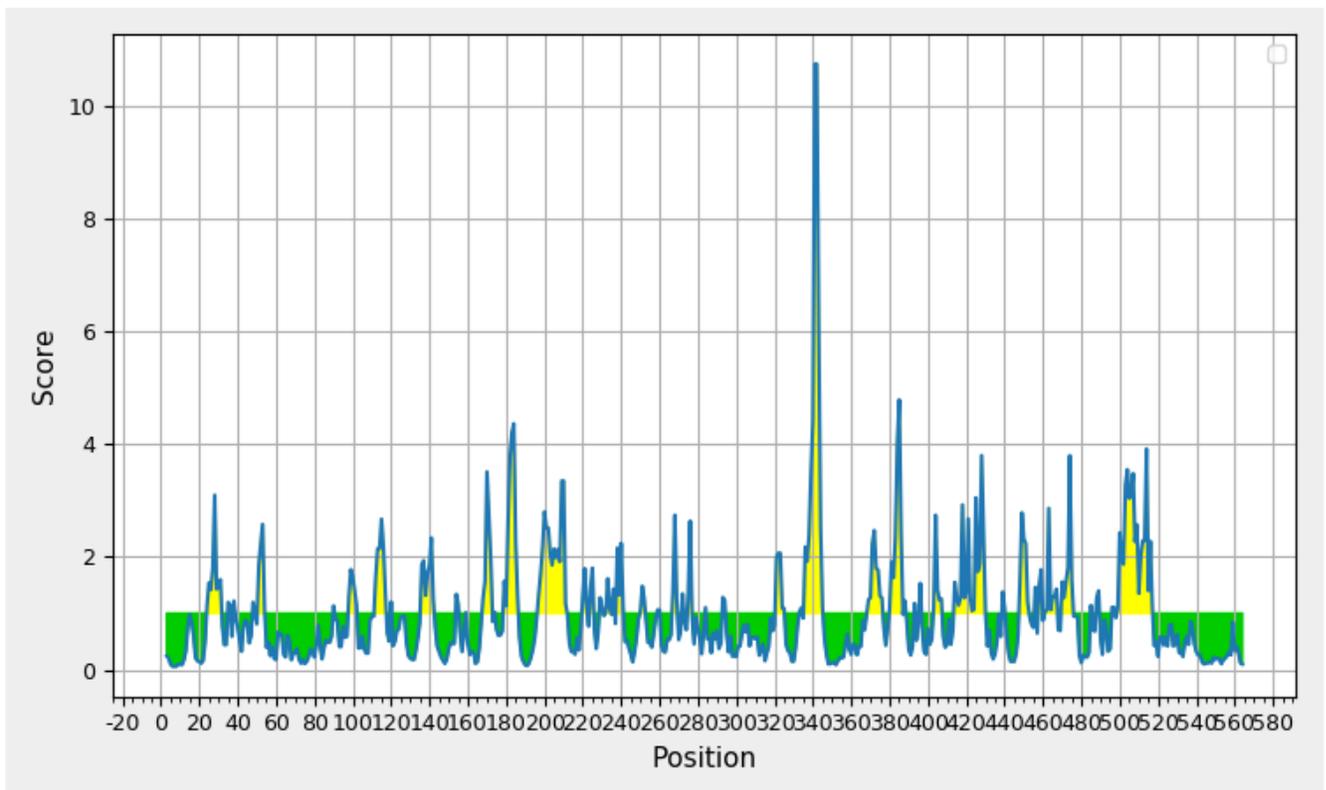
16	433	439	FLDVWTY	7
17	441	447	AELLVLM	7
18	461	470	KNLYDKVRLQ	10
19	483	491	FEFYHKCDN	9
20	503	508	DYPQYS	6
21	519	556	SGVKLESVGTQILSIYSTAASSLALAIMMAGLSL WMC	38



**Figura 10. Identificación de epítomos antigénicos.**

**Tabla 3.** Predicción de epítomos lineales accesibles a partir de la secuencia aminoacídica de la hemaglutinina.

No.	Inicio	Fin	Epítomos	Longitud
1	24	31	HANNSTEQ	8
2	112	117	NDYEEL	6
3	136	142	SSWPNHE	7
4	179	186	SYNNTNRE	8
5	197	211	SNNAEEQTNLYKNPT	15
6	336	345	SPLREKRRKR	10
7	369	376	YHHSNEQG	8
8	380	386	AADKEST	7
9	414	430	EFNNLERRIENLNKKME	17
10	461	467	KNLYDKV	7
11	470	475	QLRDNA	6
12	499	517	NGTYDYPQYSEEARLKREE	19



**Figura 11.** Identificación de epítomos accesibles.

## 7.4 Identificación de epítomos de células T

En la Tabla 4 y en la Tabla 5 se muestran los epítomos de linfocitos T citotóxicos (CTL) y epítomos linfocitos T auxiliares (HTL), respectivamente.

**Tabla 4.** Epítomos de linfocitos T citotóxicos (CTL) predichos mediante el servidor NetMHCIIpan-4.3.

No.	Posición	Alelo	Péptido	1-log50k(aff)	Affinity(nM)	%Rank
1	0	HLA-B40:06	MENIVL LLA	0.494	239.50	0.17
2	126	HLA-B40:06	FEKILIP K	0.245	3538.71	2.00
3	139	HLA-B40:06	HETSLG VSA	0.451	379.99	0.30
4	239	HLA-B40:06	GRMDFF WTI	0.257	3095.69	2.00
5	256	HLA-B40:06	FESNGN FIA	0.494	237.56	0.17
6	354	HLA-B40:06	IEGGWQ GMV	0.274	2580.85	2.00
7	372	HLA-B40:06	NEQSGS YAA	0.335	1337.59	1.00
8	446	HLA-B40:06	MENERT LDF	0.254	3196.23	2.00
9	514	HLA-B40:06	REEISGV KL	0.301	1925.58	1.58
10	522	HLA-B40:06	LESVGT YQI	0.441	421.09	0.40
11	48	HLA-B41:04	LEKTHN GKL	0.387	755.78	1.50

**Tabla 5.** Epítipo de linfocitos T auxiliares (HTL) seleccionados por el servidor NetMHC II pan 4.0.

No.	Posición	Alelo	Péptido	%Rank
1	89	DRB1_1402	VPEWSYIVERANPAN	0.45
2	90	DRB1_1402	PEWSYIVERANPAND	0.08
3	91	DRB1_1402	EWSYIVERANPANDL	0.11
4	92	DRB1_1402	WSYIVERANPANDLC	1.44
5	110	DRB1_1402	SLNDYEELKHMLSRI	4.12
6	111	DRB1_1402	LNDYEELKHMLSRIIN	2.33
7	125	DRB1_1402	NHFEEKILIIPKSSWP	1.83
8	126	DRB1_1402	HFEEKILIIPKSSWPN	0.98
9	127	DRB1_1402	FEKILIIPKSSWPNH	1.97
10	128	DRB1_1402	EKILIIPKSSWPNHE	0.441
11	160	DRB1_1402	FRNVVWLIKKNDAYP	1.30
12	161	DRB1_1402	RNVVWLIKKNDAYPT	0.76
13	162	DRB1_1402	NVVWLIKKNDAYPTI	2.18
14	172	DRB1_1402	AYPTIKISYNNTNRE	2.35
15	173	DRB1_1402	YPTIKISYNNTNRED	0.71

16	174	DRB1_1402	PTIKISYNNTNREDL	1.24
17	175	DRB1_1402	TIKISYNNTNREDLL	3.14
18	203	DRB1_1402	QTNLYKNPTTYISVG	4.93
19	209	DRB1_1402	NPTTYISVGTSTLNQ	4.18
20	210	DRB1_1402	PTTYISVGTSTLNQR	1.87
21	253	DRB1_1402	DAIHFESNGNFIAPE	4.04
22	254	DRB1_1402	AIHFESNGNFIAPEY	3.62
23	261	DRB1_1402	GNFIAPEYAYKIVKK	4.03
24	264	DRB1_1402	IAPEYAYKIVKKGDS	2.34
25	265	DRB1_1402	APEYAYKIVKKG DST	0.27
26	266	DRB1_1402	PEYAYKIVKKG DSTI	0.15
27	267	DRB1_1402	EYAYKIVKKG DSTIM	0.17
28	268	DRB1_1402	YAYKIVKKG DSTIMK	2.10
29	302	DRB1_1402	NSSMPFHNIHPLTIG	4.25
30	303	DRB1_1402	SSMPFHNIHPLTIGE	1.67
31	304	DRB1_1402	SMPFHNIHPLTIGEC	3.42
32	317	DRB1_1402	ECPKYVKS NKLVLAT	2.12
33	318	DRB1_1402	CPKYVKS NKLVLATG	0.93
34	319	DRB1_1402	PKYVKS NKLVLATGL	1.03
35	374	DRB1_1402	EQSGGYAADKESTQK	4.26
36	375	DRB1_1402	QSGGYAADKESTQKA	1.63
37	376	DRB1_1402	GSGGYAADKESTQKAI	1.40
38	403	DRB1_1402	KMNTQFEAVGREFNN	0.96
39	404	DRB1_1402	MNTQFEAVGREFNNL	0.64

40	405	DRB1_1402	NTQFEAVGREFNNLE	0.31
41	406	DRB1_1402	TQFEAVGREFNNLER	3.68
42	503	DRB1_1402	DYPQYSEEARLKREE	2.34
43	504	DRB1_1402	YPQYSEEARLKREEI	2.38
44	89	DRB1_1366	VPEWSYIVERANPAN	2.91
45	90	DRB1_1366	PEWSYIVERANPAND	1.60
46	91	DRB1_1366	EWSYIVERANPANDL	2.10
47	125	DRB1_1366	NHFEEKILIPKSSWP	3.96
48	126	DRB1_1366	HFEEKILIPKSSWPN	2.20
49	127	DRB1_1366	FEKILIPKSSWPNH	1.74
50	128	DRB1_1366	EKILIPKSSWPNHE	3.00
51	158	DRB1_1366	SFFRNVVWLIKKNDA	3.83
52	159	DRB1_1366	FFRNVVWLIKKNDAY	2.33
53	160	DRB1_1366	FRNVVWLIKKNDAYP	1.18
54	161	DRB1_1366	RNVVWLIKKNDAYPT	1.55
55	173	DRB1_1366	YPTIKISYNNTNRED	1.70
56	174	DRB1_1366	PTIKISYNNTNREDL	1.54
57	175	DRB1_1366	TIKISYNNTNREDLL	1.92
58	176	DRB1_1366	IKISYNNTNREDLLI	4.92
59	240	DRB1_1366	GRMDFFWTILKPDDA	1.97
60	241	DRB1_1366	RMDFFWTILKPDDAI	1.41

61	242	DRB1_1366	MDFFWTILKPDDAIH	0.97
62	243	DRB1_1366	DFFWTILKPDDAIHF	2.25
63	264	DRB1_1366	IAPEYAYKIVKKGDS	1.43
64	265	DRB1_1366	APEYAYKIVKKG DST	0.52
65	266	DRB1_1366	PEYAYKIVKKG DSTI	0.49
66	267	DRB1_1366	EYAYKIVKKG DSTIM	0.61
67	268	DRB1_1366	YAYKIVKKG DSTIMK	2.85
68	303	DRB1_1366	SSMPFHNIHPLTIGE	4.58
69	316	DRB1_1366	GECPKYVKS NKLVLA	2.26
70	317	DRB1_1366	ECPKYVKS NKLVLAT	1.53
71	318	DRB1_1366	CPKYVKS NKLVLATG	1.09
72	319	DRB1_1366	PKYVKS NKLVLATGL	1.28
73	374	DRB1_1366	EQGSGYAADKESTQK	4.07
74	375	DRB1_1366	QGSGYAADKESTQKA	2.67
75	376	DRB1_1366	GSGYAADKESTQKAI	2.76
76	402	DRB1_1366	DKMNTQFEAVGREFN	3.89
77	403	DRB1_1366	KMNTQFEAVGREFNN	0.90
78	404	DRB1_1366	MNTQFEAVGREFNNL	0.94
79	405	DRB1_1366	NTQFEAVGREFNNLE	0.66
80	406	DRB1_1366	TQFEAVGREFNNLER	3.40

81	409	DRB1_1366	EAVGREFNNLERRIE	2.02
82	410	DRB1_1366	AVGREFNNLERRIEN	0.33
83	411	DRB1_1366	VGREFNNLERRIENL	0.27
84	412	DRB1_1366	GREFNNLERRIENLN	0.17
85	413	DRB1_1366	REFNNLERRIENLNK	0.88
86	416	DRB1_1366	NNLERRIENLNKKME	4.66
87	417	DRB1_1366	NLERRIENLNKKMED	0.67
88	418	DRB1_1366	LERRIENLNKKMEDG	0.31
89	419	DRB1_1366	ERRIENLNKKMEDGF	0.35
90	420	DRB1_1366	RRIENLNKKMEDGFL	1.47
91	502	DRB1_1366	YDYPQYSEEARLKRE	3.55
92	503	DRB1_1366	DYPQYSEEARLKREE	2.22
93	504	DRB1_1366	YPQYSEEARLKREEI	2.45
94	121	DRB1_1310	LSRINHFEEKILIIPK	2.94
95	125	DRB1_1310	NHFEEKILIIPKSSWP	2.11
96	126	DRB1_1310	HFEEKILIIPKSSWPN	0.84
97	127	DRB1_1310	FEKILIIPKSSWPNH	0.49
98	128	DRB1_1310	EKILIIPKSSWPNHE	1.01
99	159	DRB1_1310	FFRNVVWLIKKNDAY	1.95
100	160	DRB1_1310	FRNVVWLIKKNDAYP	0.77
101	161	DRB1_1310	RNVVWLIKKNDAYPT	0.62
102	162	DRB1_1310	NVVWLIKKNDAYPTI	2.70

103	173	DRB1_1310	YPTIKISYNNTNRED	3.17
104	174	DRB1_1310	PTIKISYNNTNREDL	4.62
105	261	DRB1_1310	GNFIAPEYAYKIVKK	4.30
106	266	DRB1_1310	PEYAYKIVKKGDSTI	4.67
107	417	DRB1_1310	NLERRIENLNKKMED	1.41
108	418	DRB1_1310	LERRIENLNKKMEDG	0.67
109	419	DRB1_1310	ERRIENLNKKMEDGF	0.68
110	420	DRB1_1310	RRIENLNKKMEDGFL	2.44
111	463	DRB1_1310	LYDKVRLQLRDNAKE	4.17
112	464	DRB1_1310	YDKVRLQLRDNAKEL	4.52
113	466	DRB1_1310	KVRLQLRDNAKELGN	4.02
114	467	DRB1_1310	VRLQLRDNAKELGNG	1.88
115	468	DRB1_1310	RLQLRDNAKELGNGC	3.42
116	503	DRB1_1310	DYPQYSEEARLKREE	4.24
117	504	DRB1_1310	YPQYSEEARLKREEI	4.34
118	37	DRB1_1445	EKNVTVTHAQDILEK	2.89
119	120	DRB1_1445	MLSRINHFEEKIIP	2.34
120	121	DRB1_1445	LSRINHFEEKIIPK	1.18
121	122	DRB1_1445	SRINHFEEKIIPKS	2.51
122	125	DRB1_1445	NHFEEKIIPKSSWP	1.77
123	126	DRB1_1445	HFEEKIIPKSSWPN	0.72
124	127	DRB1_1445	FEKILIIPKSSWPNH	0.46
125	128	DRB1_1445	EKILIIPKSSWPNHE	0.95
126	159	DRB1_1445	FRNVVWLIKKNDAY	1.86
127	160	DRB1_1445	FRNVVWLIKKNDAYP	0.73
128	161	DRB1_1445	RNVVWLIKKNDAYPT	0.63

129	162	DRB1_1445	NVVWLIKKNDAYPTI	2.86
130	172	DRB1_1445	AYPTIKISYNNTNRE	2.07
131	173	DRB1_1445	YPTIKISYNNTNRED	0.98
132	174	DRB1_1445	PTIKISYNNTNREDL	1.87
133	175	DRB1_1445	TIKISYNNTNREDLL	4.70
134	261	DRB1_1445	GNFIAPEYAYKIVKK	4.22
135	318	DRB1_1445	CPKYVKSNKLVLATG	3.18
136	319	DRB1_1445	PKYVKSNKLVLATGL	3.62
137	405	DRB1_1445	NTQFEAVGREFNNLE	5.00
138	418	DRB1_1445	LERRIENLNKKMEDG	3.30
139	419	DRB1_1445	ERRIENLNKKMEDGF	3.58
140	467	DRB1_1445	VRLQLRDNAKELGNG	3.96

## 7.5 Validación del modelo de la estructura tridimensional de la He

El modelo de la estructura tridimensional de la proteína He se predijo mediante el servidor Phyre<sup>2</sup>, el cual presentó un porcentaje de identidad con respecto a la secuencia aminoacídica del 75%. El modelo se refinó con el servidor GalaxyRefine para la mejora de las características de estabilidad y calidad de la estructura tridimensional. El análisis del diagrama de Ramachandran mediante el servidor PROCHECK evidenció que el 90.7% (398 residuos) se encontraron en las regiones más favorables en el modelo refinado de la estructura (Figura 12). La validación del modelo refinado mediante el servidor ProSA-web evidenció un Z-Score de  $-9.26$  (Figura 13). El análisis de minimización de energía del modelo estructural de la He con el programa Swiss-Pdb Viewer se estableció en  $-28514.775$  KJ / mol (Figura 14). El análisis de la geometría del modelo por el servidor MolProbity validó la calidad de la estructura tridimensional de la proteína He.

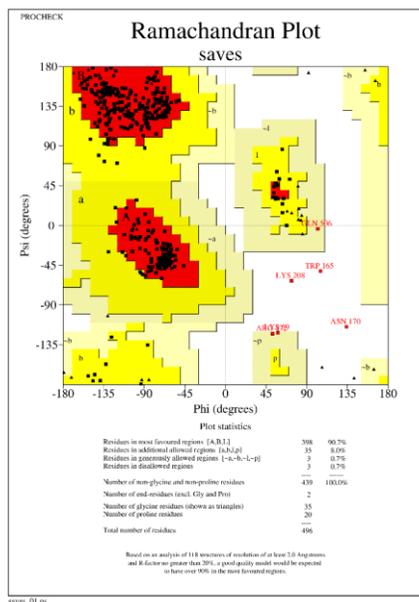
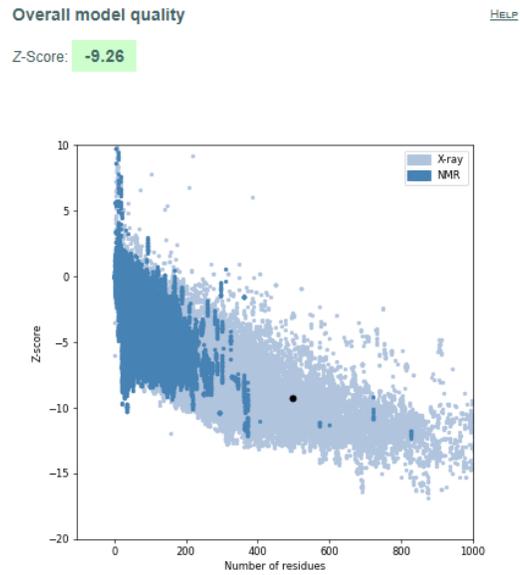
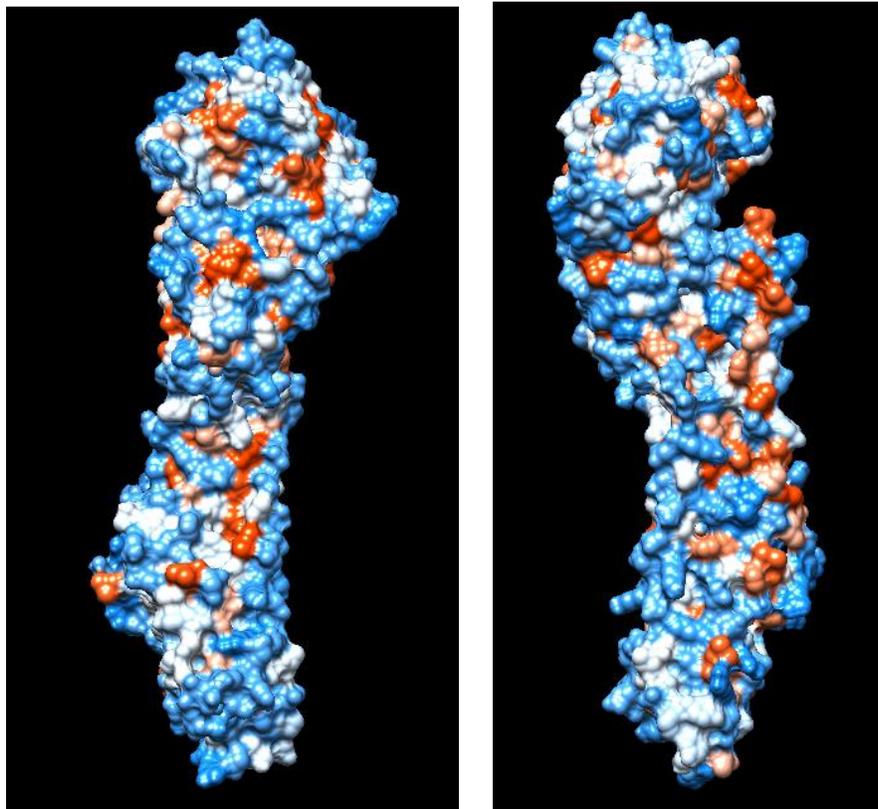


Figura 12. Diagrama de Ramachandran plot. Evaluación de la calidad del modelo estructural.



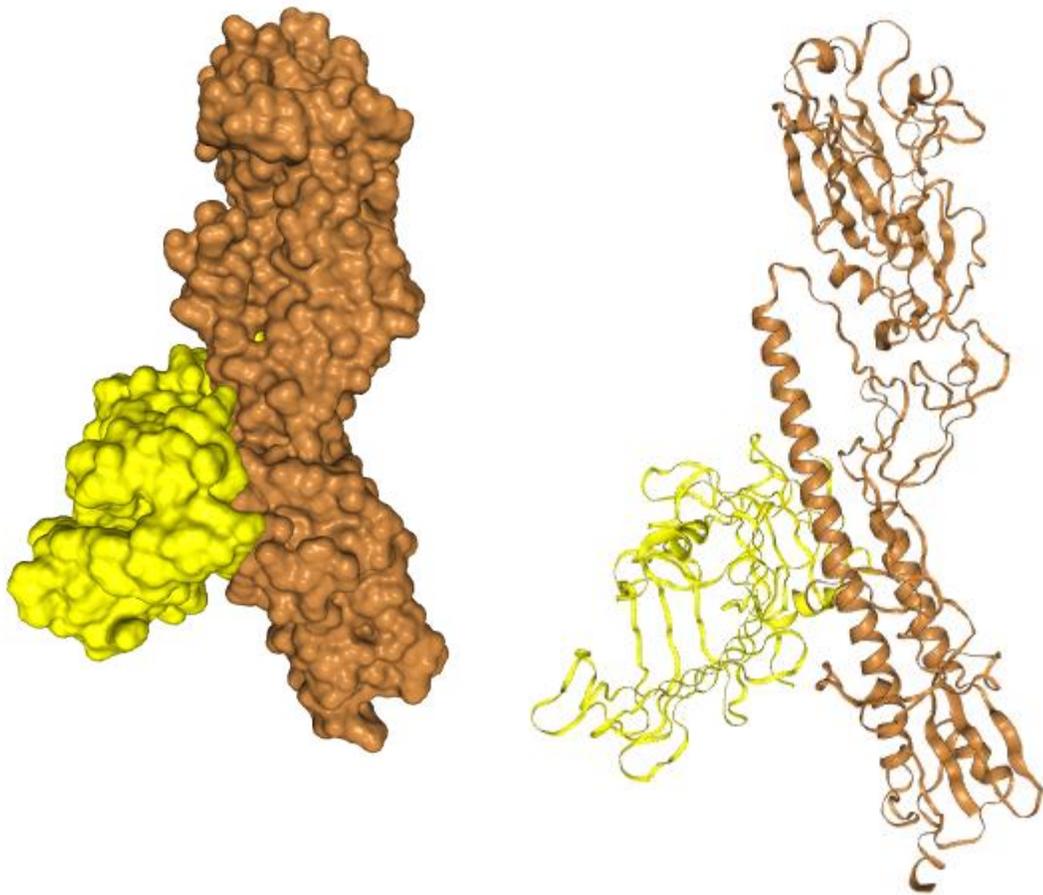
**Figura 13. Análisis de la calidad del modelo estructural de la proteína He.**



**Figura 14. Modelo refinado de la estructura tridimensional de la He.** En color rojo las regiones hidrofóbicas y en color azul las regiones hidrofílicas. Visualización mediante el programa UCSF Chimera.

## 7.6 Evaluación de la interacción mediante acoplamiento molecular

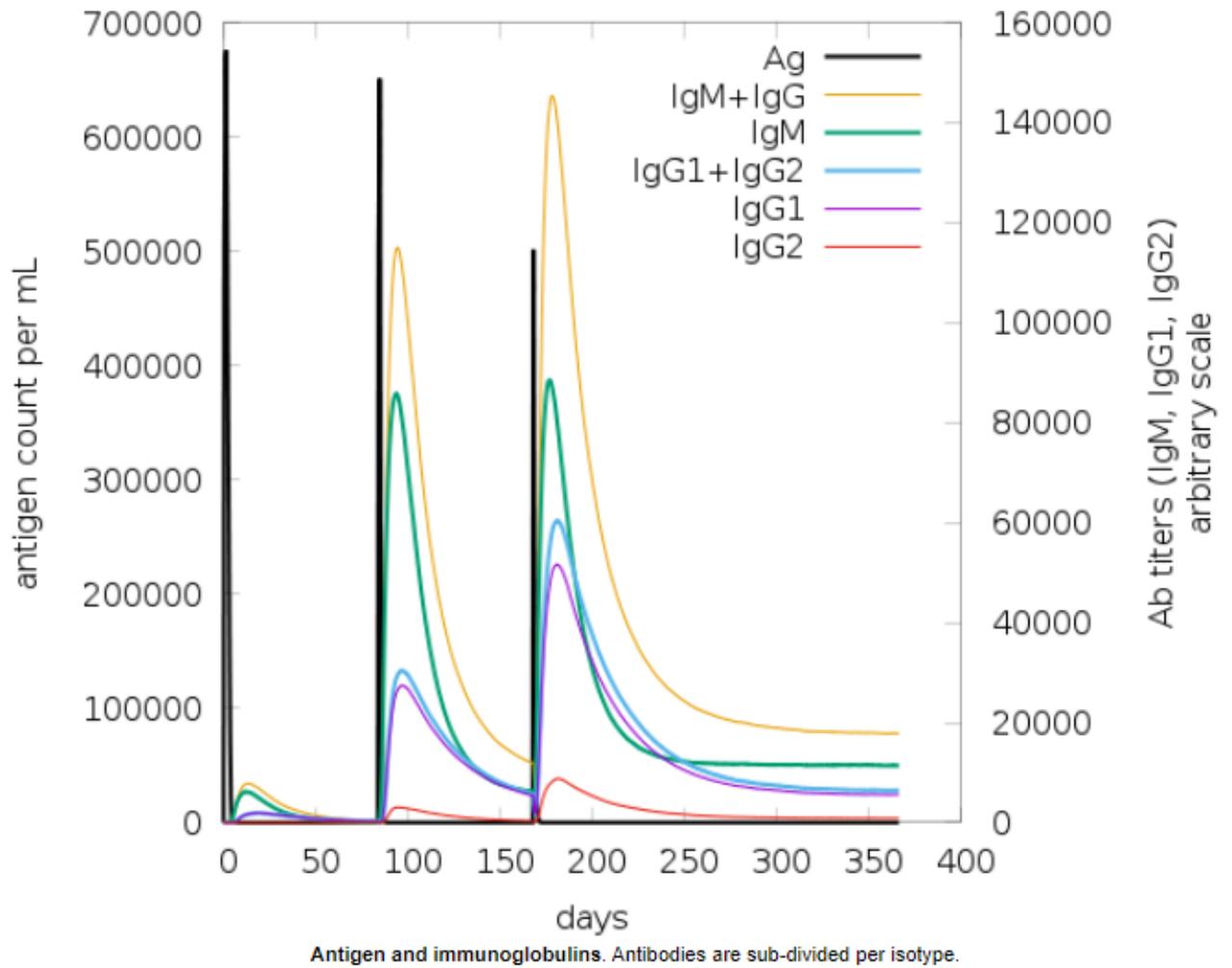
Los resultados del acoplamiento molecular mediante el servidor HDOCK, el cual se alimentó con el modelo refinado de la estructura tridimensional de la proteína He generada con el servidor Phyre2 y la estructura de la proteína ChTLR4 obtenida desde el PDB, evidenciaron un valor de afinidad de  $-263.07$  kcal/mol, así como un valor de confianza de  $0.9056$ . Así mismo, se obtuvo un valor de rmsd ( $\text{\AA}$ ) de unión a ligando de  $66.79$  de interacción con la proteína He (Figura 15).



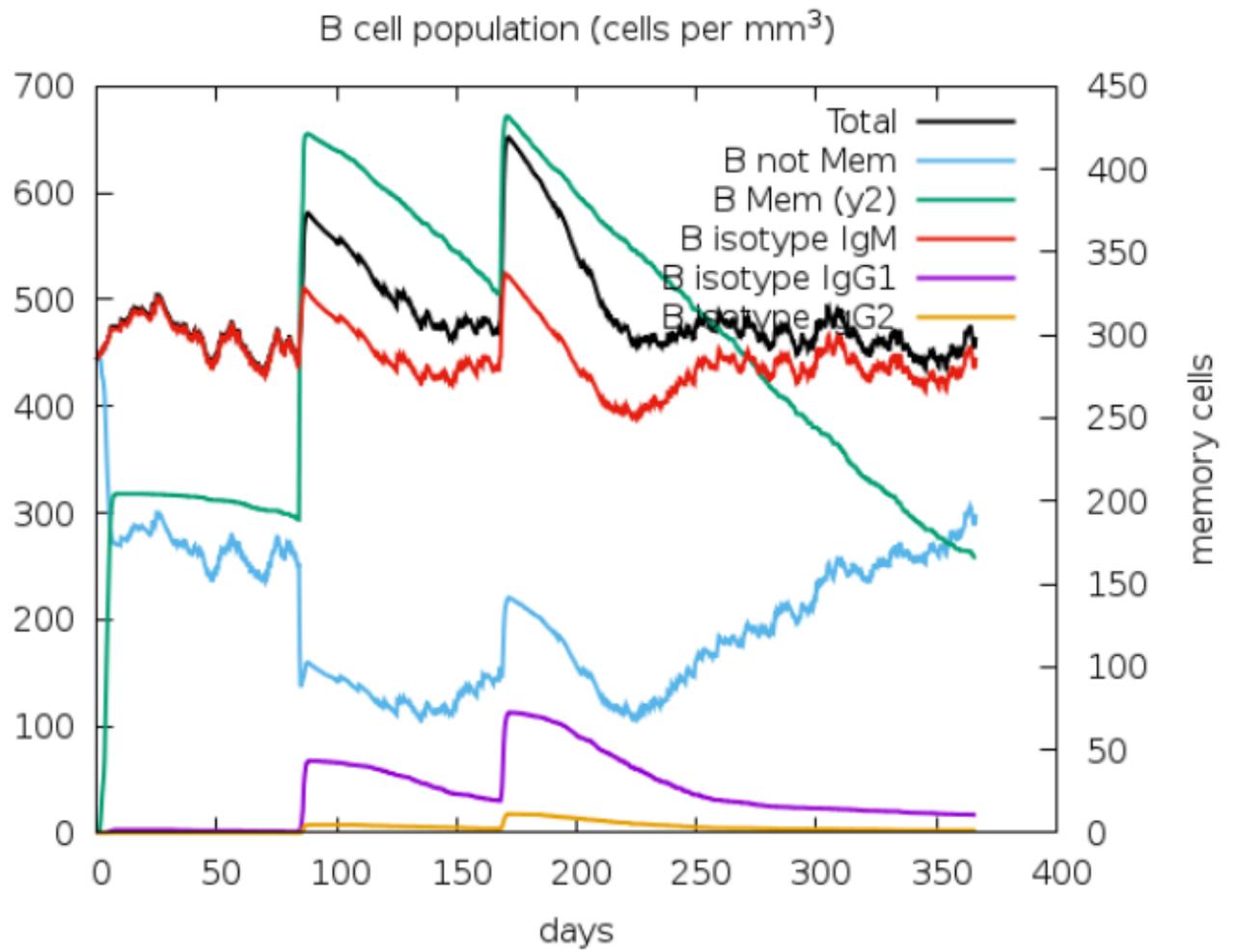
**Figura 15. Predicción de la interacción molecular.** Interacción entre la proteína He (estructura color café) y la proteína ChTLR4 (estructura color amarillo) mediante el servidor HDOCK.

## 7.7 Simulación inmunológica

Mediante el servidor C-ImmSim se evaluó la capacidad de la He de inducir una respuesta inmunológica en tres dosificaciones mediante vía inyección (Figura 16).

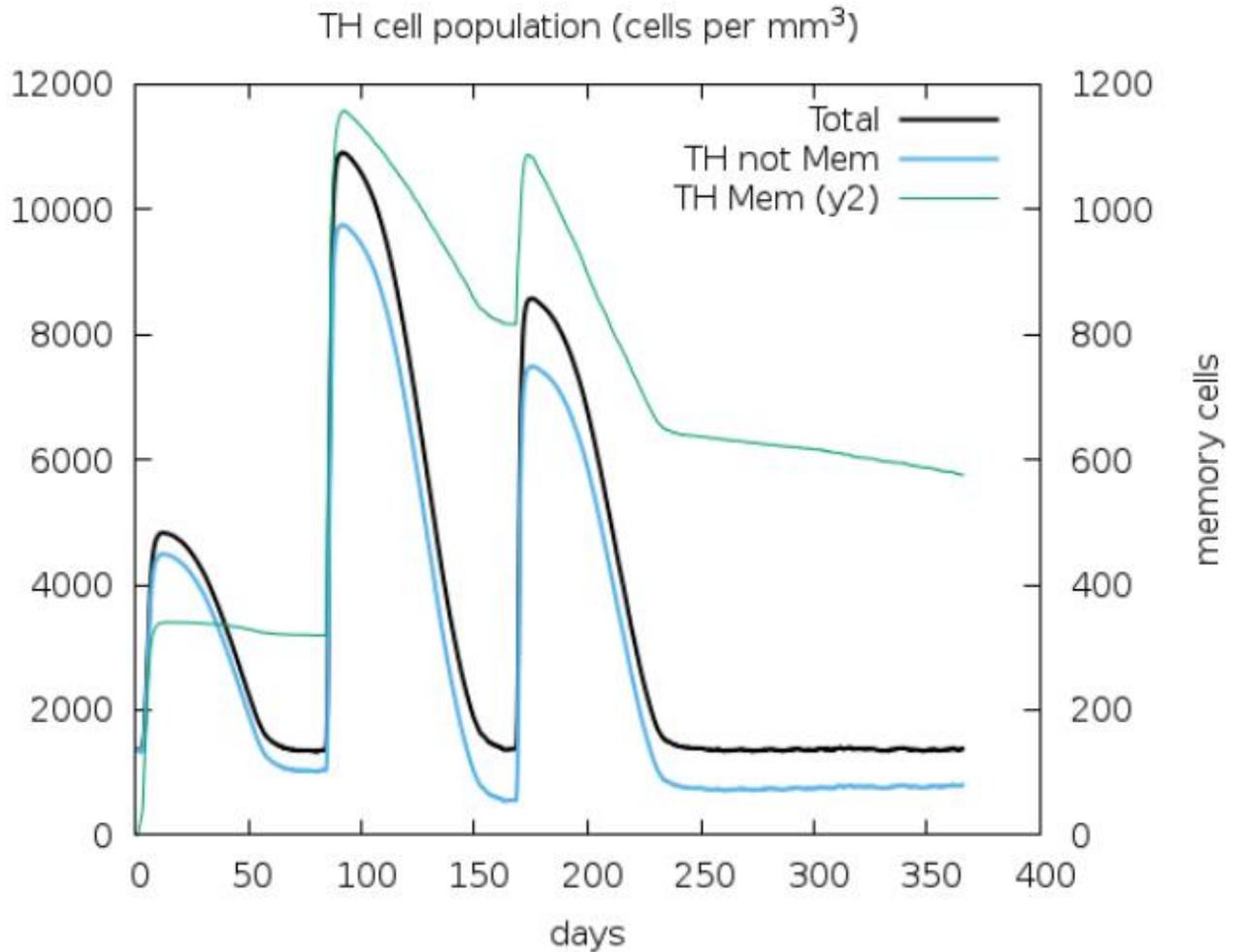


(A)



B lymphocytes: total count, memory cells, and sub-divided in isotypes IgM, IgG1 and IgG2.

(B)



(C)

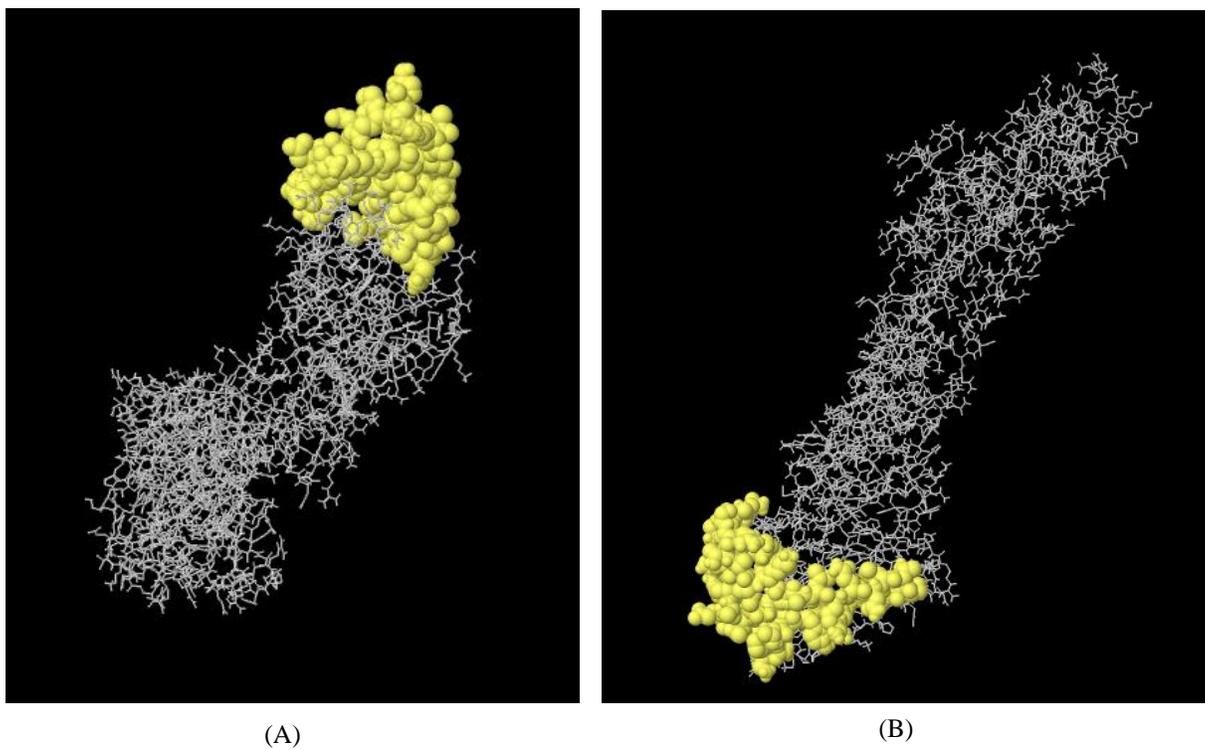
**Figura 16. Simulación inmune *in silico* tras la aplicación de la proteína He.** (A) Producción de anticuerpos en respuesta a la administración de la He (líneas negras verticales); (B) Nivel de población de células Beta; (C) Nivel de población de células T.

## 7.8 Identificación de epítomos discontinuos de células Beta

En la Tabla 6 se presentan la predicción de los epítomos discontinuos en el modelo refinado de la estructura tridimensional de la He. En la Figura 17 se ejemplifica la localización de los epítomos discontinuos de células Beta del clúster 1 y clúster 2 en el modelo tridimensional de la He.

**Tabla 6.** Epítomos discontinuos identificados en la estructura tridimensional de la He.

Clúster	Residuos	Número de residuos	Score
1	_:D17, _:Q18, _:I19, _:C20, _:A25, _:N335, _:S336, _:P337, _:L338, _:R339, _:E340, _:K341, _:R342, _:R343, _:K344, _:R345, _:G346, _:L347, _:F348, _:G349, _:A350, _:I351, _:A352, _:G353, _:F354, _:I355, _:E356, _:G357, _:G358, _:W359, _:G361, _:M362, _:V363, _:D364, _:G365, _:Y369, _:H370, _:H371, _:S372, _:N373, _:E374, _:Q375, _:G376, _:S377, _:G378, _:Y379, _:A380, _:A381, _:D382, _:K383, _:K461, _:N462, _:Y464, _:D465, _:K466, _:V467, _:R468, _:L469, _:Q470, _:L471, _:R472, _:D473, _:N474, _:A475, _:K476, _:E477, _:L478, _:G479, _:N480, _:G481, _:C482, _:F483, _:E484, _:F485, _:Y486, _:H487, _:K488, _:C489, _:D490, _:N491, _:E492, _:C493, _:M494, _:E495, _:S496, _:V497, _:R498, _:N499, _:G500, _:T501, _:Y502, _:D503, _:Y504, _:P505, _:Q506, _:Y507, _:S508, _:E509, _:E510, _:A511, _:R512	101	0.747
2	_:C106, _:Y107, _:P108, _:E128, _:I130, _:L131, _:I132, _:I133, _:P134, _:K135, _:S136, _:S137, _:W138, _:P139, _:N140, _:H141, _:E142, _:T143, _:S144, _:L145, _:G146, _:V147, _:S148, _:A149, _:A150, _:C151, _:P152, _:G155, _:A156, _:P157, _:S158, _:F159, _:V163, _:V164, _:W165, _:L166, _:I167, _:K168, _:K169, _:N170, _:D171, _:A172, _:Y173, _:P174, _:T175, _:I176, _:K177, _:I178, _:S179, _:Y180, _:N181, _:N182, _:T183, _:N184, _:R185, _:E186, _:D187, _:L188, _:H196, _:S197, _:N198, _:N199, _:A200, _:E201, _:E202, _:Q203, _:T204, _:N205, _:L206, _:K208, _:N209, _:P210, _:T211, _:T212, _:Y213, _:I214, _:S215, _:V216, _:G217, _:T218, _:S219, _:T220, _:L221, _:N222, _:Q223, _:R224, _:L225, _:A226, _:P227, _:K228, _:I229, _:A230, _:T231, _:R232, _:S233, _:Q234, _:V235, _:N236, _:G237, _:Q238, _:R239, _:G240, _:R241, _:L249, _:K250, _:P251, _:D252, _:D253, _:A254, _:I255, _:H256, _:F257, _:E258, _:S259, _:N260, _:G261, _:N262, _:F263, _:P266, _:E267, _:K271	121	0.708
3	_: T34, _:I35, _:M36, _:E37	4	0.649
4	_:F415, _:I422, _:N424, _:L425, _:K428	5	0.638
5	_:N416, _:N417, _:L418, _:R420	4	0.613
6	_:K56, _:Y287, _:G288, _:H289, _:C290	5	0.552
7	_:N26, _:N27, _:S28, _:T29, _:E30	5	0.535
8	_:Q31, _:V32, _:D33, _:K38, _:N39, _:V40, _:T41	7	0.505



**Figura 17. Visualización de los epítomos discontinuos en la secuencia de la He.** En color amarillo el clúster de epítomos discontinuos en el modelo refinado de la He; (A) Clúster 1; (B) Clúster 2.

## 7.9 Diseño del gen sintético y clonación *in silico*

La optimización del gen he con los codones de *Chlamydomonas reinhardtii* el cual codifica la proteína He presentó una longitud de 1704 pb (Figura 18). El contenido promedio de GC en la secuencia nucleotídica del gen sintético he fue de 56.61 %. La secuencia optimizada del gen sintético he se clonó *in silico* en el vector de expresión Algevir entre los sitios de restricción *SmaI* 5' y *BamHI* 3', río abajo del promotor AlcA y con el terminador 35S.

### Optimized sequence

```
ATGGAGAACATCGTGCTGCTGCTCGCGATTGTGTCGCTGGTCAAGTCGGACCAGATCTGTATCGGGTACCACGCCAAC
AATCCACCGAACAGGTGGACACCATCATGGAGAAGAACGTGACGGTCACACACGCGCAGGACATCCTGGAGAAGAC
CCATAACGGCAAGCTGTGCGACCTGAACGGTGTGAAACCGCTGATCCTGAAGGACTGCTCTGTGGCCGGCTGGCTGC
TGGGGAACCCCATGTGCGACGAGTTCATCCGCGTGCCAGAGTGGAGTTATATCGTGGAGCGAGCAAACCCGGCGAA
CGATCTCTGCTACCCAGGATCCCTGAATGATTACGAGGAGCTCAAGCACATGCTGTGCGAGGATCAACCACTTCGAGAA
GATTCTCATCATCCCCAAGAGCAGCTGGCCCAACCACGAGACGTCGCTGGGGGTGAGCGCCGCTGCCCGTACCAGG
GCGCTCCTTATTCTTCCGCAACGTGGTGTGGCTGATCAAGAAGAACGACGCTATCCCCTATCAAGATCTCGTACAA
CAACTAACC GCGAGGATTTGTTGATTCTGTGGGGCATCCACCACAGCAATAATGCTGAGGAGCAGACTAACCTCTA
CAAGAACCCTACCACCTACATATCAGTGGGGACATCCACGCTGAACCAGCGGCTGGCACCCAAAATCGCCACGCGTTC
GCAGGTCAACGGCCAACGCGGTCGGATGGACTTCTTCTGGACGATCTTGAAGCCCGATGACGCTATCCATTTTGAGAG
TAACGGCAACTTCATCGCGCCCGAGTACGCCTACAAGATCGTGAAGAAGGGCGACAGCACCATCATGAAGAGCGGGC
TGGAGTACGGCCACTGCAACACCAAGTGCCAGACGCCGGTTCGGAGCCATCAACAGCTCCATGCCGTTCCACAACATC
CACCCGCTGACCATTGGCGAGTGCCCGAAGTACGTGAAAAGCAACAAGCTGGTGTGGCGACAGGCCTGCGCAACTC
CCCGTTGCGGGAAAAGCGCCGGAAGCGGGTCTCTTCGGGGCGATTGCTGGCTTTATTGAGGGCGGCTGGCAGGGC
ATGGTGGATGGCTGGTACGGCTACCATCACAGCAATGAGCAGGGTAGCGGCTACGCGGCGGACAAGGAGAGCACGC
AGAAGGCGATTGACGGGGTACCAACAAAGTGAACAGCATAATAGATAAGATGAACACGCAGTTTGAGGCGGTGGG
ACGGGAGTTCAACAACCTGGAGCGCCGATCGAGAACCTAAACAAGAAGATGGAGGACGGCTTCTGGACGTGTGG
ACCTACAACGCGGAGCTGCTGTTACTGATGGAGAACGAACGCACATTAGACTTTCACGACAGCAACGTCAAGAACCT
GTACGACAAGGTTTCGCTTGCAGCTGCGGGACAACGCCAAGGAGCTTGGCAATGGCTGTTTCGAATTCTACCACAAGT
GCGACAACGAGTGCATGGAGTCAGTGCGGAATGGTACCTATGACTACCCGAGTACAGTGAAGGAGGCCCGCCTGAA
GCGCGAGGAGATCTCTGGGGTTAAGCTAGAGAGCGTGGGCACGTACCAAATCCTGTCCATATACAGTACGGCAGCAA
GCTCGCTCGCGCTGGCCATTATGATGGCGGGACTTTCGCTGTGGATGTGCTCCAATGGCAGCCTGCAGTGCAGGATTT
GTATTTGA
```

**Figura 18.** Adaptación de codones para *Chlamydomonas reinhardtii*. Secuencia optimizada del gen he para la expresión de la hemaglutinina.

## 8.0 DISCUSIÓN

En los últimos años se ha presentado un aumento en el número de casos de influenza aviar, específicamente el virus A(H5N1) clado 2.3.4.4b, actualmente es la variante de mayor importancia por sus relevantes repercusiones en aves silvestres y domésticas, lo que ha ocasionado importantes pérdidas en la industria avícola a nivel mundial, asimismo por su capacidad de cruzar la barrera ave-mamífero representa un problema de salud para una amplia variedad de mamíferos incluido los humanos. A pesar de los esfuerzos realizados en investigación y desarrollo, hasta la fecha no hay una vacuna aprobada por la Food and Drug Administration (FDA, por sus siglas en inglés) diseñada específicamente contra el virus de la influenza aviar subtipo A(H5N1) clado 2.3.4.4b basada en una plataforma de expresión microalgal. Por lo anterior se vuelve de suma importancia el diseño de una vacuna que pueda conferir protección contra el subtipo A(H5N1) clado 2.3.4.4b (Neumann et al. 2009; Rehman et al. 2024).

La vacunología inversa es una metodología novedosa que mediante el uso de tecnologías de la computación y programas bioinformáticos facilita el análisis de secuencias aminoacídicas de interés terapéutico a partir del uso de bases de datos biológicas especializadas, con el fin de identificar epítomos en secuencias de proteínas de microorganismos patógenos. Este novedoso enfoque incrementa la probabilidad de éxito para la identificación de los epítomos más idóneos como candidatos a vacunas, a su vez permite reducir los tiempos, incrementar la tasa de éxito, así como disminuir los costes asociados al desarrollo de vacunas (Sette y Rappuoli, 2010). La aplicación de la vacunología inversa ya ha sido aplicada para el desarrollo de múltiples vacunas para distintos microorganismos patógenos entre los que se encuentra la vacuna basada en epítomos contra el Rinovirus (Lapelosa et al. 2009), el virus del Dengue y el virus de la Encefalitis de Saint Louis (Hasan et al. 2013). Así mismo, los procedimientos de evaluación *in silico* para el desarrollo de vacunas mediante el enfoque de la vacunología inversa han sido validos de forma experimental (Dhama et al. 2014).

En este estudio, haciendo uso del enfoque de vacunología inversa se realizaron múltiples análisis inmunoinformáticas, los cuales permitieron identificar epítomos candidatos a vacuna de células Beta y células T de la proteína de superficie Hemaglutinina del virus A(H5N1) clado 2.3.4.4b.

El análisis de las propiedades fisicoquímicas de la He comprendió un total de 567 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 64080.34 Da. El índice de inestabilidad (II) fue de 36.15, lo que clasifica a la He como estable. El índice alifático (82.40) evidenció la termoestabilidad de la He, mientras que el índice GRAVY resultó en -0.293, lo que indica la característica de hidropatía. La solubilidad de la He fue de 0.2, lo que indica baja solubilidad. El análisis de la localización transmembranal de la secuencia de la Hemaglutinina del virus A(H5N1) clado 2.3.4.4b con el servidor TMHMM 2.0, evidenció que la mayor parte de los residuos de la secuencia aminoacídica (1-531) se encuentran expuestos, la característica de accesibilidad de los residuos favorece una adecuada interacción antígeno-anticuerpo (Kall et al. 2007). La vía de expresión subcelular mediante los servidores SLP-Local y Predictprotein establecen la vía secretora como la ruta más probable para la proteína He en un sistema de expresión eucariota, esto podría estar asociado a la localización de la proteína He en el virus. Se identificó mediante los servidores la presencia de un dominio perteneciente a la superfamilia de la Hemaglutinina, el cual abarca las posiciones 19 al 521. El servidor SignalP evidenció dos sitios incisión en la secuencia localizados en la posición 16 y 17 de la secuencia aminoacídica.

El servidor VaxiJen v2.0 evidenció que la proteína Hemaglutinina tiene el potencial de estimular una respuesta antigénica. La herramienta BLAST-P descartó la similitud de la proteína Hemaglutinina con proteínas de aves, para que sea generada una reacción cruzada, la similitud entre un antígeno y una proteína debe ser  $> 35\%$ . Así mismo, los servidores AllerTOP v.2 y AllergenFP clasificaron a la He como probable no alérgeno, lo cual sugiere que no representa un riesgo de alergenidad una vez sea administrada (Dimitrov et al. 2014).

Para que una secuencia aminoacídica pueda ser considerada como candidata a vacuna esta debe ser inmunogénica, poseer giros beta, ser antigénica y accesible. El análisis de la proteína de superficie Hemaglutinina mediante la herramienta de Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0 del IEDB, permitió la identificación de 24 epítomos altamente inmunogénicos. La inmunogenicidad es la capacidad de estimular una respuesta humoral. Esto indica que los epítomos identificados pueden estimular la producción de anticuerpos (Hughes y Gilleland, 1995).

El análisis de la antigenicidad de la proteína He se evaluó mediante el modelo Kolaskar y Tongaonkar del IEDB en el cual se identificaron 21 epítomos candidatos, así mismo la presencia de giros beta en la proteína se encuentra relacionada a la antigenicidad de la proteína (Vita et al. 2010). La antigenicidad está determinada por su sensibilidad de unión entre receptor y antígeno. Adicionalmente, la predicción de la accesibilidad mediante el modelo de Emini del IEDB, evidenció 12 residuos de aminoácidos accesibles en epítomos en la proteína He. Las características de accesibilidad, hidrofilia y giro beta permiten la interacción entre antígeno-anticuerpo (Fleri et al. 2017).

Debido a la ausencia de alelos MHC de aves en las bases de datos biológicas se utilizaron alelos del MHC humano para la predicción de epítomos de células T, tal como ha sido reportado en Mugunthan y Chandra en 2021 quienes utilizaron alelos MHC humanos para la identificación de epítomos para microorganismos patógenos de aves. Por tanto, fueron utilizado alelos de MHC clase I y MHC clase II para la identificación de epítomos de linfocitos T citotóxicos (CTL) y epítomos de linfocitos T auxiliares (HTL), respectivamente (Mugunthan y Chandra 2021).

La identificación de epítomos de linfocitos T citotóxicos (CTL) se realizó mediante el servidor NetMHCIIpan-4.3, el cual se identificaron 11 epítomos candidatos. La presencia de CTL posee gran importancia en el sistema inmunológico al contribuir a la eliminación de células autólogas que expresan antígenos no reconocidos. En contraste con la inmunidad humoral, la capacidad de activación de los CTL se encuentra en función de receptores de membrana mientras que los receptores de antígenos de CTL poseen interacción con determinadas secuencias peptídicas en asociación con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Se ha demostrado que los CTL específicos de virus poseen una función crítica para el control de la infección viral (Reynisson et al. 2020). Así mismo, mediante el servidor servidor NetMHC II pan se identificaron 140 péptidos que interactúan con los alelos DRB1:1482, DRB1:1366, DRB1:1310 y DRB1:144.

La evaluación del modelo refinado de la estructura tridimensional de la He mediante el diagrama de Ramachandran evidenció que el 90.7% (398 residuos) de la He se encontraron en las regiones más favorables, un valor superior al 90% está relacionado con una buena calidad del modelo estructural (Sheik et al. 2002).

La validación del modelo mediante el servidor ProSA-web evidenció un Z-Score de  $-9.26$ . El análisis de minimización de energía del modelo estructural de la He con el programa Swiss-Pdb Viewer se estableció en  $-28514.775$  KJ / mol, evidenciando la estabilidad del modelo diseñado. Mediante el servidor MolProbity se realizó el análisis de la geometría del modelo el cual validó la adecuada calidad del modelo estructural de la He.

Los resultados del acoplamiento molecular mediante el servidor HDOCK el cual se alimentó con el modelo refinado de la estructura tridimensional de la proteína He, y mediante el modelo de predicción *ab initio* se realizó la simulación de interacción con la proteína receptora de ave ChTLR4 extraída desde el PDB, la cual evidenció una afinidad de unión hacia la proteína He con un valor de  $-263.07$  kcal/mol, y una interacción con la región de la secuencia aminoacídica que comprende el dominio de la superfamilia de la Hemaglutinina. Así mismo, los resultados mediante acoplamiento molecular fueron similares a los obtenidos por Awadelkareem y Ali, quienes en el 2020 haciendo uso de análisis basados en acoplamiento molecular evaluaron la glicoproteína de pico (S) del coronavirus causante de la Bronquitis infecciosa en aves domésticas (Awadelkareem y Ali 2020).

La capacidad de inducir una respuesta inmunológica fue evaluada mediante el servidor C-ImmSim, se evidenció un aumento considerable en el título de anticuerpos a partir de la primera dosis. Así mismo, se registró un aumento importante en las poblaciones de células B y células T. Estos resultados evidencian la capacidad de la proteína He de inducir de manera contundente una respuesta inmunológica. Así mismo, se identificaron 252 epítomos discontinuos de células B en diferentes regiones expuestas en la estructura tridimensional de la proteína He mediante el servidor ElliPro del IEDB (Mortazavi et al. 2024).

Las microalgas como plataforma para la producción de proteínas recombinantes y su aplicación como vacunas orales es una alternativa que ofrece importantes ventajas, entre las que se encuentra mayores tasas de crecimiento, altos niveles de expresión, facilidad de transformación y estabilidad genética (Dyo y Purton, 2018). Además, no requiere el uso de tierras fértiles para su cultivo y no existe el riesgo por contaminación cruzada entre cultivos. Se seleccionó la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* como sistema de expresión, ya que está reportado la producción exitosa de vacunas, siendo un organismo modelo que ha sido utilizado con éxito para la producción de un gran número de compuestos de interés terapéutico (Gunasekaran y Gothandam 2020). Además, *Chlamydomonas reinhardtii* es generalmente reconocido como seguro (GRAS, por sus siglas en inglés) por la FDA siendo idónea para la producción de vacunas, así como para su potencial uso como vacuna comestible (Soria-Guerra et al. 2014). Adicionalmente, mediante genética inversa se obtuvo la secuencia nucleotídica del gen he que codifica para la proteína de cápside He, la cual se optimizó con los codones preferenciales de *Chlamydomonas reinhardtii* para la obtención de altos niveles de expresión de la He. El gen he que codifica la He evidenció una longitud de 1704 pb. El contenido promedio de GC en la secuencia nucleotídica del gen he fue de 56.61 % el cual se encuentra dentro del porcentaje ideal en contenido de GC (30-70%). Se seleccionó el vector Algevir como sistema de expresión ya que se ha reportado la expresión exitosa de proteínas víricas y subunidades de toxinas bacterianas. Además, es un sistema de expresión inducible que permite obtener mayores rendimientos en menor tiempo, con la ventaja de conservar la antigenicidad de la proteína de interés (Castellanos-Huerta, et al. 2016; Prayugo et al. 2023). Así mismo, la nueva construcción del vector con la secuencia nucleotídica del gen he se nombró pAlgevir-He. En este trabajo de investigación se evaluó mediante herramientas bioinformáticas la proteína de cápside del virus de la influenza aviar A(H5N1) clado 2.3.4.4b el cual evidenció mediante herramientas inmunoinformáticas la capacidad de estimular una respuesta inmunológica, sin ser un riesgo de alergenicidad para el ave. Por consiguiente, serán necesarios estudios adicionales *in vitro* e *in vivo* para validar los resultados del uso de la proteína de superficie hemaglutinina como potencial vacuna contra la influenza aviar.

## **9.0 CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos a partir de los análisis bioinformáticos evidencian que la proteína de superficie hemaglutinina posee epítomos de células Beta y células T capaces de inducir una respuesta inmune, esto sugiere que los epítomos pueden ser utilizados como vacuna para el control de la infección por influenza aviar. Así mismo, la secuencia se optimizó para ser expresada en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* con la finalidad de ser utilizada como una plataforma basada en microalgas con la finalidad de ser administrada al ave y brindar protección de manera efectiva contra el virus de la influenza aviar A(H5N1) clado 2.3.4.4b, sin que represente un riesgo de alergenicidad y toxicidad. Ensayos adicionales *in vitro* e *in vivo* serán necesarios para verificar la eficacia y seguridad de la vacuna.

## **10. PERSPECTIVAS**

La identificación de epítomos con características de vacuna mediante las distintas herramientas inmunoinformáticas en la proteína de superficie hemaglutinina del virus A(H5N1) clado 2.3.4.4b con la finalidad de inducir una respuesta inmunológica y conferir protección ante la influenza aviar, lo que permitiría ser una medida para combatir y brindar un mayor control ante los brotes recurrentes de influenza aviar presentes a nivel mundial, y reducir los impactos económicos en el sector avícola asociados a la infección vírica.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Gomma M, Moatasim Y, Taweel A, Mahmoud S, Rifay A, Kandeil A, McKenzie P, Webby R, El-Shesheny R, Ali M, Kayali G. 2023. We are underestimating, again, the true burden of H5N1 in humans. *BMJ Glob Health* 8: e013146.
2. Cui Y, Li Y, Li M, Zhao L, Wang D, Tian J, Bai X, Ci Y, Wu S, Wang F, Chen X, Ma S, Qu Z, Yang C, Liu L, Shi J, Guan Y, Zeng X, Tian G, Cui P, Deng G, Jiang Y, Chen P, Liu J, Wang X, Bao H, Jiang Li, Suzuki Y, Li Ch, Li Y, Chen H. 2020. Evolution and extensive reassortment of H5 influenza viruses isolated from wildbirds in China over the past decade. *Emerging Microbes & Infections* 9: 1793–1803.
3. Lambert S, Durand B, Andraud M, Delacourt R, Scoizec A, Bouquin S, Rautureau S, Bauzile B, Guiant C, Fourtune L, Guérin J-L, Paul M, Vergne T. 2022. Two major epidemics of highly pathogenic avian influenza virus H5N8 and H5N1 in domestic poultry in France, 2020–2022. *Transboundary and emerging diseases* 69: 3160-3166.
4. Rehman S, Effendi M, Witaningruma A, Nnabuikeb U, Bilal M, Abbas A, Abbas RZ, Hussain K. 2022. Avian influenza (H5N1) virus, epidemiology, and its effects on backyard poultry in Indonesia: a review. *F1000Res* 11:1321.
5. Tian J, Bai X, Li M, Zeng X, Xu J, Li P, Wang M, Song X, Zhao Z, Tian G, Liu L, Guan Y, Li Y, Chen H. 2021. Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1) Clade 2.3.4.4b Introduced by Wild Birds, China, 2021. *Emerging Infectious Diseases* 29:1367-1375.
6. Lim C, Komarasamy T, Adnan N, Radhakrishnan A, Balasubramaniam V. 2024. Recent Advances, Approaches and Challenges in the Development of Universal Influenza Vaccines. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 18: e13276.
7. Ponne S, Kumar R, Vanmathi S, Brilhante R, Kumar Ch. 2024. Reverse engineering protection: A comprehensive survey of reverse vaccinology-based vaccines targeting viral pathogens. *Vaccine* 42:2503-2518

8. Specht E, Mayfield S. 2014. Algae-based oral recombinant vaccines. *Frontiers in Microbiology* 5: 1-7.
9. Kurup V, Thomas J. 2020. Edible Vaccines: Promises and Challenges. *Mol Biotechnol* 62:79–90.
10. Imperia E, Bazzani L, Scarpa F, Borsett A, Petrosillo N, Giovanetti M, Ciccozzi M. 2023. Avian Influenza: Could the H5N1 Virus Be a Potential Next Threat? *Microbiol. Res.* 14: 635–645
11. Krammer F, Cherry S. 2023. We need to keep an eye on avian influenza. *nature reviews immunology* 23: 267–268.
12. Peiris J, Yu W, Leung C, Cheung C, Ng W, Nicholls J, Ng T, Chan K, Lai S, Lim W, Yuen K, Guan Y. 2004. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *Lancet* 363: 617–19.
13. Tong S, Li Y, Rivaviller P, Conrardy Ch, Castillo D, Chen Li, Recuenco S, Ellison J, Davis Ch, York I, Turmelle A, Moran D, Rogers S, Shi M, Tao Y, Weil J, Tang K, Rowe L, Sammons S, Xu X, Frace M, Lindblade K, Cox N, Anderson L, Rupprecht Ch, Donis R. 2012. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *PNAS* 109:4269-4274
14. Dey P, Ahuja A, Panwar J, Choudhary P, Rani S, Kaur M, Sharma A, Kaur J, Yadav A, Sood V. Babu A, Bhadada S, Singh G, Barnwal R. 2023. Immune Control of Avian Influenza Virus Infection and Its Vaccine Development. *Vaccines* 11:593.
15. Charostad J, Rukerd M, Mahmoudvand S, Bashash D, Hashemi S, Nakhaie M, Zandi K. 2023. A comprehensive review of highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1: An imminent threat at doorstep. *Travel Medicine and Infectious Disease* 55:102638
16. Oli A, Obialor O, ifeanyichukwu M, Odimegwu D, Okoyeh J, Emechebe G, Adejumo S, Ibeanu G. 2020. Immunoinformatics and Vaccine Development: An Overview. *ImmunoTargets and Therapy* 9:13–30.
17. Dey P, Ahuja A Panwar J, Choudhary P, Rani S, Kaur M, Sharma A, Kaur J, Yadav A, Sood V, Babu A, Bhadada S, Singh G, Barnwal R. 2023. Immune

Control of Avian Influenza Virus Infection and Its Vaccine Development. *Vaccines* 11:593

18. Nielsen M, Andreatta M, Peters B, Buus S. 2020. Immunoinformatics: Predicting Peptide–MHC Binding. *Annual Review of Biomedical Data Science* 3:191-215.
19. Floudas C, Fung H, McAllister S, Mönnigmann M, Rajgaria R. 2006. Advances in protein structure prediction and de novo protein design: A review. *Chemical Engineering Science* 61:966-988.
20. Torrisi M, Pollastri G, Le Q. 2020. Deep learning methods in protein structure prediction. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 18: 1301-1310.
21. Hardin C, Pogorelov T, Schulten Z. 2002. Ab initio protein structure prediction. *Current Opinion in Structural Biology* 12:176-181.
22. Criado M, Sánchez S, Ferreirás C. 2008. Classic vaccinology and advances in vaccine design. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 26: 564-572
23. He Y, Xiang Z, Mobley H. 2010. Vaxign: The First Web-Based Vaccine Design Program for Reverse Vaccinology and Applications for Vaccine Development *BioMed Reserch International* 2010: 1-10
24. Rappuoli R, Bottomley M, D'Oro U, Finco O, Gregorio E. 2016. Reverse vaccinology 2.0: Human immunology instructs vaccine antigen design. *J Exp Med* (2016) 213: 469–481.
25. Burton D. 2017. What Are the Most Powerful Immunogen Design Vaccine Strategies? *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9: a030262
26. Sette A, Fikes J. 2003. Epitope-based vaccines: an update on epitope identification, vaccine design and delivery. *Current Opinion in Immunology* 15:461-470
27. Specht E, Mayfield S. 2014. Algae-based oral recombinant vaccines. *Frontiers in Microbiology* 5:60.
28. Vega A, Angulo C, Hernández B, Escalante E. 2021. Microalgae-made vaccines against infectious diseases. *Algal Research* 58: 102408

29. Yan N, Fan Ch, Chen Y, Hu Z. 2016. The Potential for Microalgae as Bioreactors to Produce Pharmaceuticals. *International Journal of Molecular Sciences* 17:962
30. Neumann G, Chen H, Gao G, Shu Y, Kawaoka Y. 2009. H5N1 influenza viruses: outbreaks and biological properties. *Cell Research* 20:51-61
31. Rehman S, Khadija B, Widya L, Shakeeb U, Muhammad K, Adamu A, Ali Z, Shah M, Malik M, Yulianto A, Jamal M. 2024. The Evolution of H5N1 Influenza Viruses in Indonesia to Mammalian Hosts: A Review of Molecular Markers. *World's Poultry Science Journal* 1–22
32. Sette A, Rappuoli R. 2010. Reverse Vaccinology: Developing Vaccines in the Era of Genomics. *Immunity* 33:530-541.
33. Lapelosa M, Gallicchio E, Arnold GF, Arnold E, Levy R. 2009. In silico vaccine design based on molecular simulations of rhinovirus chimeras presenting HIV-1 gp41 epitopes. *J Mol Biol.* 385:675–691.
34. Hasan M, Hossain M, Alam M. 2013. A computational assay to design an epitope-based Peptide vaccine against Saint Louis encephalitis virus. *Bioinform Biol Insights* 7:347–355.
35. Dhama K, Chakraborty S, Tiwari R, Verma A, Saminathan M, Amparl, Malik Y, Nikoousefat Z, Javdani M, Khan R. 2014. A concept paper on novel technologies boosting production and safeguarding health of humans and animals. *Res. Opin. Anim. Vet. Sci.* 4:353-370.
36. Kall L, Krogh A, Sonnhammer E. 2007. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. *Nucleic Acids Research* 35: W429–W432
37. Dimitrov I, Bangov I, Flower D, Doytchinova I. 2014. AllerTOP v.2—a server for in silico prediction of allergens. *J Mol Model* 20:2278
38. Hughes E, Gilleland H. 1995. Ability of synthetic peptides representing epitopes of outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa* to afford protection against *P. aeruginosa* infection in a murine acute pneumonia model. *Vaccine* 13:1750–1753.

39. Vita R, Zarebski L, Greenbaum J, Emami H, Hoof I, Salimi N, Damle R, Sette A, Peters B. 2010. The Immune Epitope Database 2.0. *Nucleic Acids Research* 38: D854–D862
40. Fleri W, Paul S, Dhanda S, Mahajan S, Xu X, Peters B, Sette A. 2017. The Immune Epitope Database and Analysis Resource in Epitope Discovery and Synthetic Vaccine Design. *Frontiers in Immunology* 8: 278
41. Mugunthan S, Chandra H. 2021. A Computational Reverse Vaccinology Approach for the Design and Development of Multi-Epitopic Vaccine Against Avian Pathogen *Mycoplasma gallisepticum*. *Frontiers in Veterinary Science* 8:721061
42. Reynisson B, Alvarez B, Paul S, Peters B, Nielsen M. 2020. NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data. *Nucleic Acids Research* 48: W449–W454
43. Sheik S, Sundararajan P, Hussain A, Sekar K. 2002. Ramachandran plot on the web. *Bioinformatics* 18:1548–1549
44. Awadelkareem E, Ali S. 2020. Vaccine Design against Coronavirus Spike (S) Glycoprotein in Chicken: Immunoinformatic and Computational Approaches. *Transl med commun* 5.
45. Mortazavi B, Molaei A, Fard N. 2024. Multi-epitope vaccines, from design to expression; an in-silico approach. *Human Immunology* 23:110804
46. Dyo M, Purton S. 2018. The algal chloroplast as a synthetic biology platform for production of therapeutic proteins. *Microbiology* 164:113-121
47. Gunasekaran B, Gothandam K. 2020. A review on edible vaccines and their prospects. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 53: e8749
48. Soria-Guerra E, Ramírez-Alonso I, Ibáñez-Salazar A, Govea-Alonso O, Paz-Maldonado T, Bañuelos-Hernández B, Korban S, Rosales-Mendoza S. 2014. Expression of an HBcAg-based antigen carrying angiotensin II in *Chlamydomonas reinhardtii* as a candidate hypertension vaccine. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 116:133-139

49. Castellanos-Huerta I, Bañuelos-Hernández B, Téllez G, Rosales-Mendoza S, Briebe L, Esquivel-Ramos E, Beltrán-López J, Velazquez G, Fernandez-Siuob I. 2016. Recombinant Hemagglutinin of Avian Influenza Virus H5 Expressed in the Chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* and Evaluation of Its Immunogenicity in Chickens. *AVIAN DISEASES* 60:784–791.
50. Prayugo A, Subroto T, Arnafia W. 2023. Efficacy of Hemagglutinin Gene of Highly Pathogenic Avian Influenza as a Vaccine Candidate in Poultry: A Review. *World Vet J* 13: 26-31