



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUÍS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**Posgrado en Ciencias en
Bioprocesos**

**Validación Bioinformática y Experimental
de un Antígeno Recombinante Contra el
Virus de la Viruela Símica.**

Tesis que para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias en Bioprocesos

Presenta:

Armendáriz Vázquez Daniela

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

Codirector de tesis: **Dra. Alejandra Wong Arce**



UASLP-Sistema de Bibliotecas

Repositorio Institucional Tesis Digitales Restricciones de Uso

DERECHOS RESERVADOS

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo, mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto o con fines de lucro, reproducción, edición o modificación será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Validación bioinformática y experimental de un antígeno recombinante contra el virus de la viruela símica © 2026 por Armendáriz Vázquez, Daniela se distribuye bajo una licencia de [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Biofármacos del Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina (CICSab), adscrito a la Facultad de Ciencias Químicas, en el periodo comprendido entre junio de 2025 y julio de 2026, bajo la dirección del Dr. Sergio Rosales Mendoza y de la Dra. Alejandra Wong Arce.

El programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados de Calidad (SNP) del SECIHTI, registro 000588. Número de la beca otorgada por SECIHTI: 00058 Número de CVU 2045056.

Los datos del trabajo titulado Validación Bioinformática y Experimental de un Antígeno Recombinante Contra el Virus de la Viruela Símica se encuentran bajo el resguardo de la Facultad de Ciencias Químicas y pertenecen a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.



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

Formato M13

Aprobación de Tema de Tesis

San Luis Potosí SLP a enero/15 /2025

Dr. Sergio Rosales Mendoza
Director de Tesis

Habiendo revisado su solicitud para el registro de título de tesis de la alumna **Daniela Armendáriz Vázquez**, Estudiante de Maestría en Ciencias en Bioprocesos.

Esta Coordinación a mi cargo, le informa que el Comité Académico del Posgrado (CAP), avaló y consideró **APROBADO** el registro de Título de tesis:

Validación bioinformática y experimental de un antígeno recombinante contra el virus de la
viruela símica.

Sin más por el momento, quedo de Uds.

ATENTAMENTE

Dr. Jaime David Pérez Martínez
Coordinador del Posgrado PCBP



Comité de Ética en Investigación y Docencia de la Facultad de Ciencias Químicas
Registro Número CONBIOÉTICA-24-CEI-003-20190726

19 abril de 2023

DR. SERGIO ROSALES MENDOZA
PROFESOR INVESTIGADOR,
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, UASLP
PRESENTE.

Con relación a su solicitud de revisión del protocolo modificado titulado **"Producción y caracterización de prototipos de vacunas contra el Virus de la Viruela Símica (VVS)"**, se le comunica que éste fue evaluado en la sesión del 19 de abril del año en curso por el Comité Ética en Investigación y Docencia de la Facultad de Ciencias Químicas (CEID-FCQ) (registro CONBIOÉTICA-24-CEI-003-20190726) y dictaminado como:

APROBADO

Su protocolo tiene la clave **CEID2023-03-R1**

Es necesario puntualizar que la aprobación de este protocolo a realizar en las instalaciones del CICSaB de la UASLP, obedece a que el investigador principal está adscrito a la FCQ y realiza formalmente actividades de investigación en dichas instalaciones, las cuales podrán ser sometidas a comprobación de su idoneidad por el CEI-FCQ.

Conforme al Reglamento del CEID-FCQ, todo protocolo registrado y aprobado queda sujeto al seguimiento señalado en el Art. 13, en particular al apartado 13.2.2:

El profesor o investigador responsable deberá entregar al CEID-FCQ un informe al término del proyecto, ante la suspensión prematura del estudio o cuando le sea requerido. Si el proyecto no ha sido terminado en el lapso de un año deberá entregarse un informe anual que señale el grado de avance. Para la entrega de este informe se considerará un año transcurrido desde la fecha de emisión del dictamen de aprobación y un lapso no mayor de 10 días hábiles. El incumplimiento de lo anterior impedirá la revisión de un nuevo protocolo del investigador solicitante. El informe se enviará al CEID-FCQ con una carta de presentación dirigida al Presidente, así como el respectivo informe.

ATENTAMENTE

Dra. Silvia Romano Moreno
Presidente del CEID-FCQ

Ccp. Archivo

Confirmando de recibido (26 abril de 2023):

Av. Dr. Manuel Nava Núm. 6
Zona Universitaria • CP 78210
San Luis Potosí, S.L.P.
tel. (444) 826 24 40 al 46
fax (444) 826 2372



www.uaslp.mx



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



Posgrado en Ciencias en Bioprocesos

**Validación Bioinformática y Experimental de un
Antígeno Recombinante contra el Virus de la Viruela**

Tesis que para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias en Bioprocesos

Presenta:

Armendáriz Vázquez Daniela

SINODALES:

Presidente: Dra. Alejandra Wong Arce

Secretario: Dr. Sergio Rosales Mendoza

Vocal: Dra. Ruth Elena Soria Guerra

Vocal: Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler

SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

Agosto, 2026

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORIAL ACADÉMICO

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

Dra. Alejandra Wong Arce: Codirector de tesis. Adscrito al Posgrado en Ciencias de Bioprocesos en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dra. Ruth Elena Soria Guerra: Tutor de tesis. Adscrito al Posgrado en Ciencias de Bioprocesos en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler: Tutor de tesis. Adscrito al Posgrado en Ciencias de Bioprocesos en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.



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

Formato M5

Carta Cesión de Derechos

San Luis Potosí SLP a agosto/17 /2026

En la ciudad de San Luis Potosí el día 17 del mes de agosto del año 2026 El que suscribe Daniela Armendáriz Vázquez Alumna del programa de posgrado de Ciencias de Bioprocesos adscrito a Facultad de Ciencias Químicas (FCQ) manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo terminal, realizado bajo la dirección de: Dr. Sergio Rosales Mendoza y Dra. Alejandra Wong Arce cede los derechos del trabajo titulado Validación bioinformática y experimental de un antígeno recombinante contra el virus de la viruela símica a la **Universidad Autónoma de San Luis Potosí**, para su difusión con fines académicos y de investigación.

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

Daniela Armendáriz Vázquez



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

Formato M28

Carta de Análisis de Similitud

San Luis Potosí SLP a 09/10/2026

LB. María Zita Acosta Nava
Biblioteca de Posgrado
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Asunto: Reporte de porcentaje de similitud de tesis de grado

Por este medio me permito informarle el porcentaje de similitud obtenido mediante Ithenticate para la tesis titulada "Validación Bioinformática y Experimental de un Antígeno Recombinante Contra el Virus de la Viruela Símica" presentada por la autora Daniela Armendáriz Vázquez. La tesis es requisito para obtener el grado de Maestría en el Posgrado en Ciencias en Bioprocesos. El análisis reveló un porcentaje de similitud de 8% excluyendo referencias y metodología.

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

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

A T E N T A M E N T E

Dra. Alicia Grajales Lagunes
Coordinador Académico del Posgrado
en Ciencias en Bioprocesos

Dedicatoria

Dedico esta tesis a mi familia, mis amigas y a mi novio, por creer siempre en mí, por acompañarme durante este camino y por brindarme su apoyo y sus palabras de aliento en cada etapa de este proyecto.

Y, de manera muy especial, a la Dani que comenzó este camino. Por la constancia, la paciencia y el valor de seguir adelante cuando el camino parecía demasiado largo. Hoy celebro aquella versión de mí que, aun cuando dudo de sí misma, nunca dejó de intentarlo.

Agradecimientos académicos

Al Dr. Sergio Rosales Mendoza por brindarme la oportunidad de desarrollar este proyecto bajo su dirección. Gracias por su confianza, apoyo y por compartir generosamente su conocimiento a lo largo de este proceso. Sus cuestionamientos, observaciones y capacidad para impulsar un análisis crítico de los resultados fueron fundamentales para mi formación académica y para el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Alejandra Wong Arce le agradezco profundamente su confianza, su apoyo y la oportunidad de formar parte de este proyecto. Gracias por su constante disposición para orientar este trabajo, por sus valiosas observaciones y por el seguimiento cercano que brindó en cada etapa de la investigación. Su retroalimentación fue esencial para fortalecer este manuscrito y para mi crecimiento como profesionalista.

Asimismo, agradezco a la Dra. Ruth Elena Soria Guerra y a la Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler por el tiempo y el interés que dedicaron a este proyecto. Gracias por asistir a mis seminarios, por sus preguntas siempre constructivas y por compartir sus comentarios y sugerencias con amabilidad y profesionalismo.

Agradecimientos personales

A mi familia, por acompañarme incondicionalmente a lo largo de este camino. Gracias por estar siempre al pendiente de mí, por creer en mis capacidades incluso en los momentos en que yo misma dudaba y por brindarme palabras de aliento cuando el cansancio y la incertidumbre parecían superar la motivación. Su apoyo ha sido uno de los pilares más importantes para alcanzar esta meta.

A mis amigas, fuera de la comunidad científica, gracias por celebrar cada uno de mis logros con una emoción que muchas veces me recordó sentir orgullo por mí misma. Su cariño, confianza y entusiasmo hicieron este camino mucho más ligero y me recordaron constantemente el valor del esfuerzo realizado.

A las amigas que la ciencia me regaló, Andrea Romero, Lulu e Ile, gracias por compartir este camino conmigo. Gracias por cada consejo, por resolver dudas, por escucharme en los momentos de frustración y por motivarme a seguir adelante cuando los experimentos, los resultados o el proceso parecían demasiado difíciles. Su amistad hizo que esta etapa fuera mucho más enriquecedora, tanto en lo académico como en lo personal.

Y, finalmente, a Ulises, gracias por estar a mi lado durante todo este proceso. Aunque muchas veces el tema escapaba de tu área de conocimiento, siempre encontraste el tiempo para escucharme, interesarte por mi trabajo y acompañarme en cada avance y cada obstáculo. Gracias por creer en mí incluso cuando yo dejaba de hacerlo, por impulsarme con tus palabras y por recordarme, una y otra vez, que era capaz de llegar hasta el final. Este logro también lleva un poco de tu apoyo, paciencia y amor.

Resumen

La viruela símica (mpox), un *Orthopoxvirus* zoonótico emergente, ha cobrado relevancia internacional por su reemergencia y propagación fuera de las regiones endémicas, lo que pone de manifiesto su potencial epidémico. Aunque las vacunas basadas en el virus vaccinia atenuado han demostrado ser eficaces, su disponibilidad es limitada y la vacuna ideal debería formularse con antígenos específicos del virus de la viruela símica (MPXV) para ampliar la magnitud y la duración de la respuesta inmunitaria. En este contexto, las vacunas multiepitópicas representan una estrategia prometedora. En el presente estudio se diseñó y produjo en *Escherichia coli* una proteína quimérica denominada LTB-MPX, que incorpora epítomos de las proteínas A30L y E8L fusionados a la subunidad B de la enterotoxina termolábil de *E. coli* (LTB), utilizada como molécula acarreadora. La proteína LTB-MPX se expresó de manera eficiente y se recuperó a partir de cuerpos de inclusión mediante procedimientos convencionales de solubilización y renaturalización. Su inmunogenicidad se evaluó en un modelo murino, en el que fue capaz de inducir una respuesta humoral específica frente a la proteína viral E8L. En conjunto, estos resultados sientan las bases para optimizar el diseño de vacunas multiepitópicas dirigidas contra MPXV.

Palabras clave: A30L, E8L, proteína quimérica, vacuna recombinante, respuesta humoral.

Abstract

Monkeypox (MPX), an emerging zoonotic orthopoxvirus, has gained international attention following its re-emergence and spread outside of endemic areas, highlighting its epidemic potential. While vaccines based on the attenuated vaccinia virus are considered effective, their availability is limited, and the ideal vaccine should be formulated with specific MPX antigens to improve the breadth and duration of the immune response. Considering that multiepitopic-vaccines represent a promising strategy, in this study a chimeric protein called LTB-MPX, which carries epitopes from the A30L and E8L proteins fused to the heat labile *Escherichia coli* enterotoxin B subunit as carrier, was designed and produced in *E. coli*. LTB-MPX was efficiently expressed and recovered from inclusion bodies under conventional solubilization and refolding steps. Immunogenicity of LTB-MPX was assessed in test mice and it was able to induce specific humoral responses against the E8 viral target. This study sets the basis for optimizing the design of multiepitopic vaccines against MPX.

Keywords: A30L protein, E8L protein, chimeric protein, recombinant vaccine, humoral response.

Índice general

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	ZONOSIS VIRALES Y ENFERMEDADES EMERGENTES.....	1
1.2.	VIRUS MPOX: ESTRUCTURA, PATOGÉNESIS Y SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA.....	2
1.2.1.	Características generales y estructura del MPXV.....	2
1.2.2.	Antecedentes epidemiológicos y manifestaciones clínicas de mpox.....	4
1.2.3.	Transmisión y patogénesis de la infección por MPXV	5
1.2.4.	Brotos internacionales y situación epidemiológica actual	6
1.3.	TRATAMIENTO Y ESTRATEGIAS DE VACUNACIÓN CONTRA MPOX	7
1.3.1.	Tratamiento antiviral contra mpox.....	7
1.3.2.	Vacunas disponibles para la prevención de mpox.....	8
1.3.3.	Limitación de vacunas actuales y necesidad de vacunas específicas contra MPXV	9
1.4.	VACUNAS MULTIEPITÓPICAS	10
1.4.1.	Fundamento de vacunas multiepitópicas.....	10
1.4.2.	LTB como proteína acarreadora	11
1.4.3.	E. coli como sistema de expresión.....	12
1.5.	SELECCIÓN DE ANTÍGENOS PARA EL DISEÑO DE UNA VACUNA MULTIEPITÓPICA	13
1.5.1.	Formas infecciosas de MPXV y selección de antígenos de superficie	13
1.5.2.	Proteína E8L	14
1.5.3.	Proteína A30L	15
1.6.	ENFOQUE DEL PRESENTE PROYECTO	15
2.	ANTECEDENTES	16
2.1.	VACUNAS AUTORIZADAS Y NECESIDAD DE PLATAFORMAS ESPECÍFICAS CONTRA MPXV	16
2.2.	VACUNAS MULTICOMPONENTE CONTRA MPXV: EVIDENCIA EXPERIMENTAL	17
2.3.	DISEÑO INMUNOINFORMÁTICO DE VACUNAS MULTIEPITÓPICAS	20
2.4.	BRECHA DE VALIDACIÓN EXPERIMENTAL Y FUNDAMENTO DE LTB-MPX	21
3.	JUSTIFICACIÓN.....	22
4.	HIPOTESIS	22
5.	OBJETIVOS.....	22

5.1.	OBJETIVO GENERAL	22
5.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
6.	METODOLOGÍA	23
6.1.	VALIDACIÓN BIOINFORMÁTICA DEL DISEÑO DE LTB-MPX.....	23
6.2.	EXPRESIÓN DE PROTEÍNA LTB-MPX EN E. COLI	24
6.3.	EXTRACCIÓN DE LTB-MPX.....	24
6.4.	ANÁLISIS DE LTB-MPX POR SDS-PAGE	25
6.5.	PURIFICACIÓN DE LTB-MPX.....	25
6.6.	CUANTIFICACIÓN POR DENSITOMETRÍA	25
6.7.	DETECCIÓN DE ANTIGENICIDAD POR WESTERN BLOT	26
6.8.	ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN.....	26
6.9.	MUESTRAS DE SANGRE	27
6.10.	DETECCIÓN DE ANTICUERPOS	27
6.11.	CONJUGADOS DE PÉPTIDOS CON BSA	28
6.12.	DETERMINACIÓN DE LAS SUBCLASES IgG1 E IgG2A Y ESTIMACIÓN DEL PERFIL TH1/TH2	28
7.	RESULTADOS	29
7.1.	CARACTERIZACIÓN BIOINFORMÁTICA.....	29
7.2.	LTB-MPX SE EXPRESA EN FORMA DE CUERPOS DE INCLUSIÓN	31
7.3.	EL LTB-MPX SE PUEDE PURIFICAR Y REPLEGAR CON ÉXITO.....	33
7.4.	EL LTB-MPX INDUCE RESPUESTAS HUMORALES EN RATONES.....	36
7.4.1.	Respuesta inmune frente al antígeno LTB-MPX.....	36
7.4.2.	Respuesta inmune frente a los antígenos diana de mpox	38
7.4.3.	Respuesta inmune frente a péptidos sintéticos	39
7.4.4.	Respuesta inmune frente a antígeno LTB-MPX utilizando IgG1 e IgG2a como anticuerpo secundario	40
7.4.5.	Evaluación de la respuesta inmune frente al antígeno LTB-MPX, tres meses después de la última inmunización	41
7.5.	Generación de conjugados de péptidos sintéticos con BSA y evaluación de respuesta inmune	42
8.	DISCUSIÓN	44

9. CONCLUSIONES	54
10. REFERENCIAS	56
11. ANÁLISIS DE SIMILITUD	70

Índice de figuras

Figura 1. Estructura del virión del virus de mpox (MPXV).	4
Figura 2. Modelado molecular de la proteína LTB-MPX en Chimera.	31
Figura 3. Análisis por SDS-PAGE de extractos proteicos procedentes de cultivos de 1 L que expresan LTB-MPX.	33
Figura 4. Purificación y cuantificación de la proteína LTB-MPX. (A) Los cuerpos de inclusión recuperados de cultivos a escala de 1 L se solubilizaron con agentes caotrópicos y se analizaron mediante SDS-PAGE.	34
Figura 4. Purificación y cuantificación de la proteína LTB-MPX. (B) Cuantificación de la LTB-MPX mediante densitometría tras las etapas de replegamiento en un gel de SDS-PAGE al 12 % teñido con azul de Coomassie.	35
Figura 5. Evaluación de la antigenicidad de LTB-MPX.	36
Figura 6. Respuesta sistémica de IgG inducida por LTB-MPX en ratones de prueba. .	37
Figura 7. Respuesta sistémica de IgG inducida por LTB-MPX en ratones de prueba frente a los antígenos diana de mpox.	38
Figura 8. Respuesta sistémica de IgG inducida por LTB-MPX en ratones de prueba frente a péptidos sintéticos.	39
Figura 9. Respuesta sistémica de IgG inducida por LTB-MPX en ratones evaluando respuesta Th1/Th2.	41
Figura 10. Respuesta sistémica de IgG inducida por LTB-MPX tres meses después de la última inmunización.	42
Figura 11. Conjugados de péptido sintéticos con BSA.	43
Figura 12. Respuesta sistémica de IgG inducida por LTB-MPX en ratones de prueba frente a conjugados de péptidos sintéticos con BSA.	44

Índice de tablas

Tabla 1. Descripción de los grupos experimentales. Los ratones fueron asignados	27
aleatoriamente a los esquemas descritos.....	27
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de LTB-MPX	29

1. Introducción

1.1. Zoonosis virales y enfermedades emergentes

La zoonosis viral es cualquier enfermedad o infección causada por un virus que ha sido transmitida de un animal vertebrado a un humano (Reed, 2018). La transmisión de una zoonosis viral puede ser por contacto directo, indirecto o nosocomial; por aerosoles; vertical (intrauterina); y por vectores o artrópodos. Las zoonosis representan el 45% de las enfermedades infecciosas emergentes (González y Aguilar, 2023). Su incremento se atribuye principalmente a la intrusión humana en hábitats silvestres, al cambio climático y al transporte global, factores que multiplican los puntos de contacto entre especies. Actualmente, las zoonosis virales han cobrado relevancia epidemiológica debido a su rápida propagación y a la ausencia de tratamientos y/o vacunas específicas disponibles en el sector salud; demostrando vulnerabilidad en la población ante estas. En las últimas décadas, diversas epidemias o pandemias causadas por virus zoonóticos, incluidos el coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV), el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV), el coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2), el virus Ébola, el virus Nipah y el virus de la viruela símica (MPXV), han evidenciado la vulnerabilidad de la población mundial frente a estos agentes infecciosos (Weiss y Sankaran, 2022).

El proceso mediante el cual un virus supera la barrera entre especies no depende de un único evento, sino de la interacción de factores ecológicos, moleculares y sociales. La frecuencia de exposición entre animales y seres humanos aumenta con la urbanización no planificada, la modificación del uso del suelo, la deforestación, la intensificación de la producción animal y el comercio de especies. A ello se suman la movilidad internacional y la concentración de población en grandes centros urbanos, que pueden transformar una introducción localizada en un problema de alcance regional o mundial. Desde el punto de vista biológico, la capacidad del virus para reconocer receptores celulares, replicarse en el nuevo huésped y evadir su respuesta inmunitaria determina si la infección será accidental

o persistirá mediante la transmisión entre personas. Por esta razón, la prevención de zoonosis requiere vigilancia epidemiológica, diagnóstico oportuno y plataformas terapéuticas y vacunales capaces de responder con rapidez ante patógenos emergentes.

La experiencia adquirida durante las emergencias recientes también ha mostrado que el impacto de un brote no se distribuye de manera uniforme. Las poblaciones con acceso limitado a servicios de diagnóstico, tratamiento y vacunación suelen enfrentar un mayor riesgo de complicaciones y de transmisión persistente. Asimismo, la saturación hospitalaria y la interrupción de programas de salud rutinarios pueden, indirectamente, aumentar la carga de otras enfermedades. En este contexto, el desarrollo de vacunas seguras, escalables y con requisitos de producción accesibles constituye no solo un objetivo científico, sino también una estrategia de preparación sanitaria. Las plataformas recombinantes resultan especialmente atractivas porque permiten seleccionar componentes específicos del patógeno, evitar su propagación durante la manufactura y adaptar el diseño cuando surgen nuevas variantes o se identifican antígenos de mayor relevancia inmunológica.

Los brotes de enfermedades infecciosas emergentes representan una carga sanitaria, social y económica a nivel mundial. Más allá de la morbilidad y la mortalidad, los brotes pueden perturbar los sistemas de salud, el comercio internacional, el turismo, la educación y la productividad laboral. La pandemia de COVID-19 y el brote de mpox de 2022 pusieron de manifiesto la urgente necesidad de contar con estrategias para responder con rapidez a los patógenos emergentes. El brote de mpox demostró, además, que los virus considerados restringidos a un área geográfica específica pueden expandirse rápidamente y provocar emergencias sanitarias internacionales.

1.2. Virus mpox: estructura, patogénesis y situación epidemiológica

1.2.1. Características generales y estructura del MPXV

La mpox es una enfermedad zoonótica viral causada por el MPXV, perteneciente al género *Orthopoxvirus*. Es un virus envuelto con una estructura de

ADN de doble hélice. El virión mide entre 200 y 250 nanómetros, tiene forma de ladrillo y su estructura se compone de una envoltura lipoproteica, un núcleo viral, un genoma lineal de doble cadena y dos cuerpos laterales, como se muestra en la Figura 1 (Carrero & Contreras, 2022). El genoma comprende dos regiones variables a ambos lados, compuestas por genes que codifican proteínas relacionadas con la virulencia, y una región central conservada (Witt et al., 2023). Mientras tanto, la región central codifica proteínas estructurales y enzimas esenciales, que pueden inducir una respuesta de anticuerpos e incluso algunas contienen epítomos que desencadenan una respuesta de células T, lo que ofrece protección cruzada contra otros *Orthopoxvirus* (Zhai et al., 2025).

A diferencia de numerosos virus de ADN que dependen del núcleo de la célula huésped, los poxvirus realizan su ciclo replicativo en el citoplasma. Para ello, el virión debe transportar o codificar gran parte de la maquinaria necesaria para la transcripción, replicación y procesamiento de sus componentes (Witt et al., 2023). Esta relativa autonomía explica tanto el tamaño del genoma como la complejidad estructural de la partícula viral. La organización del genoma también es importante para el diseño de vacunas: la región central tiende a conservar genes esenciales para la replicación y la formación del virión, mientras que los extremos albergan con mayor frecuencia genes relacionados con el rango de huéspedes, la virulencia y la modulación de la respuesta inmunitaria (Zhai et al., 2025). En consecuencia, la identificación de antígenos conservados y expuestos en la superficie puede favorecer el diseño de prototipos con cobertura frente a diferentes clados, siempre que los epítomos seleccionados mantengan su accesibilidad y su conformación relevante.

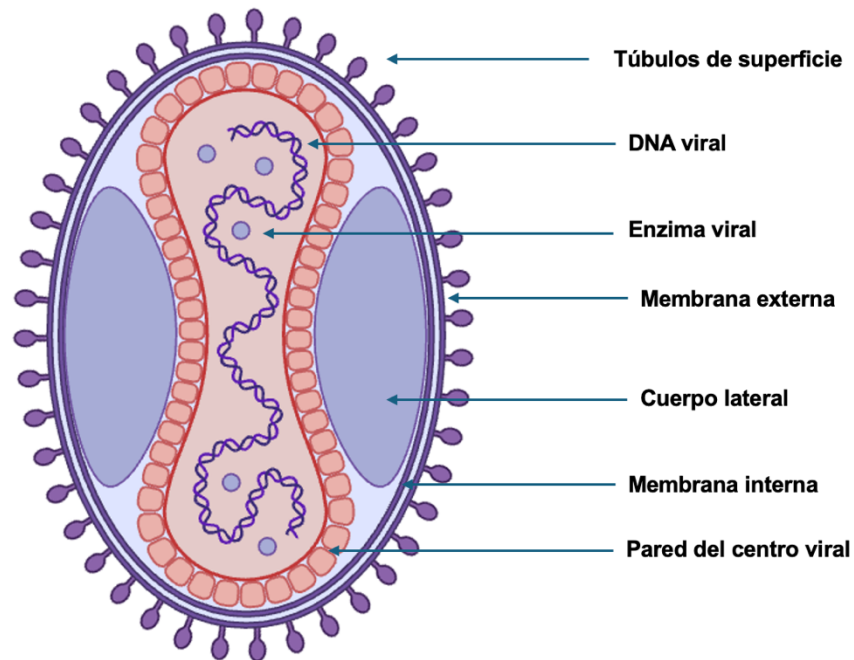


Figura 1. Estructura del virión del virus de mpox (MPXV). Representación esquemática de los componentes estructurales del virión maduro. Esquema obtenido de BioRender; etiquetas añadidas por la autora en Microsoft PowerPoint.

1.2.2. Antecedentes epidemiológicos y manifestaciones clínicas de mpox

La mpox se reportó por primera vez en 1970 en un niño de nueve años (Beer & Rao, 2019). Desde entonces han existido distintos brotes en el continente africano; sin embargo, la infección por MPXV se considera una enfermedad autolimitada donde, el periodo de incubación es de 6 a 16 días y los pacientes se recuperan a las pocas semanas. Aun cuando se ha considerado autolimitada, se han descrito casos graves en infantes y en pacientes inmunodeprimidos, con una tasa de letalidad del 3-6% (Carrero & Contreras, 2022). Los principales síntomas de la enfermedad son sarpullidos con pústulas, dolor de cabeza y corporal, fiebre, cansancio y escalofríos, lo cual complica su diagnóstico debido por la similitud con otros patógenos, como el virus varicela-zóster, los virus herpes 1 y 2, *Treponema pallidum* o *Chlamydia trachomatis* (Centros para el Control y la Prevención de

Enfermedades, 2023).

La semejanza clínica con otras enfermedades exantemáticas y de transmisión sexual puede retrasar la sospecha diagnóstica, especialmente cuando el paciente no refiere contacto conocido con un caso confirmado. La presentación clínica puede variar según la vía de exposición, el estado inmunológico, la edad y las comorbilidades. Aunque muchos cuadros evolucionan favorablemente, pueden presentarse infecciones bacterianas secundarias, compromiso ocular, encefalitis, neumonía o enfermedad diseminada. Esta heterogeneidad refuerza la importancia de combinar la evaluación clínica con métodos de confirmación molecular. También explica por qué la vacunación de grupos con mayor riesgo de exposición o de enfermedad grave constituye una herramienta complementaria a la vigilancia de contactos y al aislamiento de casos.

1.2.3. Transmisión y patogénesis de la infección por MPXV

La transmisión entre personas se produce a través de fluidos corporales, del contacto con lesiones cutáneas o con materiales contaminados. Tras la exposición, el virus penetra en los tejidos adyacentes a través de las mucosas oculares, respiratorias, bucales, uretrales o rectales o a través de lesiones cutáneas. Posteriormente, se disemina por todo el organismo mediante células inmunitarias residentes en los tejidos y en los ganglios linfáticos de drenaje (Kumar et al, 2022; Alakunle et al., 2020). Al igual que otros poxvirus, la replicación del MPXV ocurre en el citoplasma y se lleva a cabo mediante la ARN polimerasa del virus. La patogénesis del MPXV incluye la unión de las partículas virales, la fusión, la replicación del genoma viral, el ensamblaje del virión y su liberación de la célula huésped infectada (Gong et al., 2020; Shi et al., 2022). Durante estos pasos, se producen dos formas infecciosas del MPXV: el virus envuelto extracelular (EEV) y el virus maduro intracelular (IMV). El EEV se libera mediante exocitosis y consta de una membrana lipídica que envuelve la partícula intracelular IMV originada en el aparato de Golgi o en endosomas. Por otro lado, el IMV se libera durante la lisis celular y presenta una envoltura lipoproteica estable, lo que lo hace adecuado para su transmisión entre animales. La forma EEV expresa 25 proteínas de membrana, mientras que la IMV expresa proteínas como A29, A30L, E8L y M1, involucradas

en el proceso de entrada de la IMV a la célula (Freyn et al., 2022; Shchelkunov et al., 2002).

La coexistencia de IMV y EEV es relevante para la patogénesis y la selección de blancos vacunales, ya que ambas formas contribuyen a distintas etapas de la infección. El IMV es estable en el ambiente y favorece la transmisión entre huéspedes, mientras que el EEV participa de manera importante en la diseminación dentro del organismo y puede facilitar la propagación sin que se produzca lisis celular inmediata (Shi et al., 2022). Sus membranas y proteínas expuestas no son idénticas; por ello, los anticuerpos dirigidos contra una sola forma podrían no bloquear todos los mecanismos de propagación. Una estrategia racional puede combinar antígenos de ambas partículas o centrarse en proteínas del IMV que participen directamente en la adhesión y la entrada celular. Las proteínas E8L y A30L pertenecen a este segundo grupo y, al asociarse con eventos tempranos de la infección, representan blancos cuyo reconocimiento inmunitario podría interferir con el establecimiento del virus en la célula huésped.

1.2.4. Brotes internacionales y situación epidemiológica actual

En 2022 se identificaron en diversos países casos de mpox sin antecedente de viaje a zonas endémicas, incluidos países de América, Europa y otras regiones (Bunge et al., 2022). El 23 de julio de 2022, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró el brote multinacional de mpox como una Emergencia de Salud Pública de Importancia Internacional (ESPII) (Organización Panamericana de la Salud, s/f). Esta declaración concluyó en mayo de 2023, tras observarse un descenso sostenido de los casos a nivel mundial. Sin embargo, el comportamiento epidemiológico del virus continuó evolucionando: durante 2024, la expansión del clado I y la detección del subclado Ib en la República Democrática del Congo y en países vecinos motivaron una nueva declaración de ESPII. Para comprender la gravedad de este escenario, es necesario precisar que el virus del mpox se divide en dos linajes genéticos principales: el clado II, responsable del brote de 2022 y asociado a cuadros más leves, y el clado I, históricamente vinculado a una mayor virulencia (CDC, 2026). La relevancia del emergente subclado Ib radica en que representa una mutación adaptada a una transmisión sostenida y eficiente de

persona a persona —tanto por vía sexual como por contacto estrecho intrafamiliar—, lo que difiere de la dinámica zoonótica de su predecesor (el clado la) y eleva significativamente el riesgo de propagación internacional de una variante más letal. En conjunto, estos acontecimientos muestran que el MPXV tiene la capacidad de establecer cadenas de transmisión fuera de las regiones históricamente afectadas y que su vigilancia no debe limitarse a los periodos de máxima incidencia. También evidencian la necesidad de contar con intervenciones preventivas adaptadas a la diversidad genética y antigénica del virus, en particular frente a linajes emergentes.

1.3. Tratamiento y estrategias de vacunación contra mpox

1.3.1. Tratamiento antiviral contra mpox

Durante el brote internacional, algunos de los principales retos fueron la identificación de tratamientos y la aplicación de vacunas autorizadas contra mpox basadas en vaccinia pero no diseñadas exclusivamente con antígenos definidos de MPXV. En ese periodo, uno de los medicamentos de administración oral reconocidos por su eficacia para tratar la viruela del mono fue el tecovirimat. Este medicamento es un derivado del 4-trifluorometilfenol que interrumpe los pasos finales en la maduración del virus y su liberación desde la célula infectada (De La Calle-Prieto et al., 2022). En 2018, el tecovirimat fue aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) como tratamiento contra la viruela. En ensayos frente a diversos grupos de *Orthopoxvirus*, demostró una alta actividad antiviral, con una disminución significativa de la letalidad. Específicamente, en el caso de mpox, se observó que es eficaz para contrarrestar la enfermedad en animales cuando se inicia el tratamiento antes de que aparezcan los primeros brotes de sarpullidos (De La Calle-Prieto et al., 2022). En humanos, se administraron durante 15 días dos dosis diarias de 600 mg a uno de los enfermos del primer brote y se observaron pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) negativas en muestras de sangre y del tracto respiratorio superior a las 48 h de iniciado el tratamiento, sin desarrollar nuevas lesiones a partir de las 24 h de iniciado el tratamiento (De La Calle-Prieto et al., 2022).

Aunque la disponibilidad de un antiviral constituye un recurso importante, el

tratamiento farmacológico no sustituye a la prevención. Su efectividad puede depender del momento de inicio, de la gravedad del cuadro, de las condiciones del paciente y de la sensibilidad del virus. Además, durante una emergencia sanitaria, el acceso desigual a los antivirales y a las pruebas diagnósticas puede limitar su impacto a nivel poblacional. En consecuencia, el control de mpox requiere una estrategia integrada que incluya vigilancia, educación, identificación de contactos, reducción del riesgo de exposición, vacunación y tratamiento de los casos que lo requieran. El desarrollo de nuevas vacunas continúa siendo pertinente aun cuando existan opciones terapéuticas, pues una intervención preventiva puede disminuir simultáneamente la incidencia, la transmisión y la probabilidad de complicaciones.

1.3.2. Vacunas disponibles para la prevención de mpox

Otra estrategia efectiva para el control de las enfermedades infecciosas emergentes es la vacunación. A partir del brote de mpox de 2022, algunos países retomaron la vacunación contra la viruela con la vacuna ACAM2000. ACAM2000 contiene el virus vaccinia vivo, que puede replicarse en el cuerpo humano, por lo que existe una baja probabilidad de causar enfermedades en ciertas personas (Taha et al., 2024). Sin embargo, a pesar de la aplicación de esta vacuna, continuaron presentándose casos recurrentes de personas infectadas por mpox, por lo que el 9 de agosto de 2022 la FDA emitió una autorización de uso de emergencia para la vacuna JYNNEOS en adultos mayores de 18 años y en personas consideradas en riesgo de contraer mpox (FDA, 2022). La vacuna JYNNEOS contiene el virus vaccinia, un virus relacionado con el virus de la mpox y de la viruela, que ha sido atenuado y, en consecuencia, tiene una capacidad replicativa limitada.

La protección frente a MPXV mediante vacunas contra la viruela se fundamenta en la conservación antigénica entre los *Orthopoxvirus*. No obstante, ACAM2000 y JYNNEOS difieren en su capacidad de replicación, perfil de seguridad, vía de administración y población candidata. Las vacunas basadas en virus completos presentan la ventaja de exponer al sistema inmunitario a un amplio repertorio de antígenos; sin embargo, esa misma complejidad dificulta atribuir la protección a componentes específicos y puede imponer restricciones en la fabricación, la bioseguridad, el almacenamiento o la administración. Estas

consideraciones son particularmente relevantes para personas inmunocomprometidas y para regiones con infraestructura limitada. Por ello, además de optimizar el acceso a las vacunas existentes, resulta conveniente estudiar plataformas específicas para MPXV que conserven los determinantes antigénicos de interés sin incorporar componentes virales innecesarios para inducir la respuesta deseada.

1.3.3. Limitación de vacunas actuales y necesidad de vacunas específicas contra MPXV

Las estrategias basadas en el seguimiento de casos y vacunación lograron el control exitoso del brote multinacional de mpox. Sin embargo, es de suma importancia señalar que actualmente no existe una vacuna específica contra el virus mpox. En este sentido, el desarrollo de una vacuna específica contra el MPXV resulta relevante, y uno de los enfoques más directos consiste en vacunas formuladas con el patógeno inactivado. Sin embargo, esta técnica a gran escala supone un desafío considerable, ya que los riesgos de producir la vacuna son elevados. El desarrollo de vacunas ha evolucionado desde plataformas basadas en microorganismos completos hacia estrategias de diseño racional, en las que la selección de antígenos específicos permite dirigir la respuesta inmune hacia regiones altamente conservadas y funcionalmente relevantes del patógeno. Una estrategia de vacunación altamente conveniente es la de las vacunas multiepitópicas, compuestas por regiones antigénicas específicas conocidas como epítomos, cuya ventaja principal es que no requieren el manejo del patógeno vivo y pueden producirse en diferentes plataformas de expresión, lo que puede resultar en un costo relativamente menor (Hansson, Nygren, & Stahl, 2010).

Una vacuna específica basada en antígenos definidos permitiría orientar la respuesta hacia moléculas conservadas que desempeñan funciones esenciales del virus. Este planteamiento puede reducir la presencia de componentes que no contribuyen a la protección y facilitar la caracterización de la respuesta inducida. Sin embargo, seleccionar un antígeno no consiste únicamente en identificar una proteína inmunogénica: también deben considerarse su localización en el virión, la accesibilidad para los anticuerpos, la conservación entre clados, la función durante

la infección y la capacidad de procesamiento y presentación por las células del sistema inmunitario. En las vacunas de subunidades y multiepitópicas, además, la estructura final de la molécula, el orden de los epítomos, los conectores y la proteína acarreadora pueden modificar la exposición de cada región. El diseño debe, por tanto, integrar evidencia bioinformática, estructural y experimental.

1.4. Vacunas multiepitópicas

1.4.1. Fundamento de vacunas multiepitópicas

Las vacunas multiepitópicas consisten en la combinación de múltiples epítomos B y T provenientes de diferentes proteínas virales dentro de una sola formulación, con el objetivo de ampliar la cobertura inmunológica, concentrando la respuesta en los epítomos protectores a la vez que se excluyen los inmunodominantes no protectores y se favorece la generación de memoria inmunológica (Maleki et al., 2022). Aunque son capaces de generar respuestas inmunitarias, las vacunas multiepitópicas presentan, por lo general, una baja inmunogenicidad debido a su complejidad limitada. Por lo tanto, una herramienta utilizada para incrementar su potencial inmunogénico consiste en fusionar la secuencia multiepitópica con secuencias adyuvantes y/o acarreadoras.

La posibilidad de reunir determinantes de varias proteínas en una sola construcción representa una ventaja frente a la variabilidad viral y permite diseñar moléculas con objetivos inmunológicos definidos. Los epítomos de células B favorecen la generación de anticuerpos capaces de reconocer el antígeno, mientras que los epítomos de células T pueden contribuir a la activación de respuestas colaboradoras o citotóxicas y al establecimiento de la memoria inmunitaria (Jegerlehner et al., 2010). No obstante, el desempeño de un epítomo aislado puede diferir del observado en su proteína nativa. La fusión puede ocultar regiones, generar nuevas interfaces, alterar la solubilidad o favorecer la agregación. De igual modo, los conectores deben proporcionar una separación suficiente entre dominios para limitar las interferencias estéricas y permitir un procesamiento adecuado. Por ello, la evaluación experimental de la expresión, la recuperación y la inmunogenicidad sigue siendo indispensable, incluso cuando el diseño arroja resultados bioinformáticos favorables.

Desde una perspectiva productiva, estas vacunas no requieren cultivar grandes cantidades del patógeno vivo y pueden expresarse en plataformas microbianas, vegetales o celulares. Esta característica reduce los requisitos de contención biológica y facilita la modificación de la secuencia. Asimismo, una construcción recombinante puede producirse de forma estandarizada y someterse a controles fisicoquímicos definidos. Sin embargo, la sencillez conceptual no elimina los retos de manufactura: una proteína multiepitópica puede formar cuerpos de inclusión, degradarse, adoptar conformaciones no deseadas o perder epítomos durante la recuperación. La viabilidad de la plataforma depende, por tanto, de equilibrar la inmunogenicidad, la estabilidad, el rendimiento y la complejidad del proceso.

1.4.2. LTB como proteína acarreadora

Diferentes autores han utilizado la subunidad B de la enterotoxina termolábil (LTB) de *Escherichia coli* o el fragmento C-terminal de la toxina de tétanos como acarreadores para aumentar la respuesta inmune en prototipos vacunales (Liljeqvist y Ståhl, 1999). LTB es una proteína acarreadora ampliamente utilizada como adyuvante en el desarrollo de vacunas recombinantes. Su capacidad de unirse al gangliósido GM1 de las células presentadoras de antígeno (APC) favorece la captación del antígeno que transporta y potencia la activación de la respuesta inmune (Kim y Kang, 2019).

LTB se organiza naturalmente en un pentámero y reconoce con alta afinidad al gangliósido GM1 presente en la superficie de diversas células, incluidas las epiteliales y las presentadoras de antígeno. Esta interacción puede aumentar la captación de moléculas fusionadas a LTB y favorecer su procesamiento (Yin et al., 2024). Además, se ha asociado con la activación de respuestas humorales y celulares y con el aumento de las señales de presentación antigénica (Rezaee et al., 2005). En una proteína quimérica, LTB cumple así una doble función: aporta una estructura inmunogénica reconocible y actúa como vehículo para epítomos que, de manera aislada, podrían ser demasiado pequeños o poco complejos para provocar una respuesta robusta. Aun así, la fusión debe conservar tanto la accesibilidad de los epítomos como las propiedades estructurales necesarias para

que LTB desempeñe su función acarreadora.

Además de funcionar como proteína acarreadora, LTB posee propiedades adyuvantes que incrementan tanto la respuesta humoral como la celular, particularmente cuando se administra por vía mucosal o parenteral (Kaushik et al., 2019). Estas características han permitido su uso en vacunas dirigidas contra bacterias, virus y parásitos, lo que ha demostrado incrementar significativamente la inmunogenicidad de epítomos que, por sí solos, presentan baja inmunogenicidad (Rezaee et al., 2005; Yin et al., 2024). Por ello, LTB representa una molécula prometedora para la presentación de epítomos derivados del virus mpox en formato de proteínas recombinantes multiepitópicas.

1.4.3. *E. coli* como sistema de expresión

E. coli es una bacteria gramnegativa, de la familia de las enterobacterias, empleada como un sistema rápido para la producción de biofarmacéuticos de alto rendimiento (Solis-Andrade et al., 2022). Además, se puede cultivar en medios económicos alcanzando densidades celulares altas; su genética está muy bien caracterizada y se dispone de un número cada vez mayor de vectores de expresión y cepas con fenotipos específicos (Wurm et al., 2016). Una de las limitaciones de este sistema de expresión es la generación de cuerpos de inclusión, lo que requiere pasos adicionales para la purificación, la recuperación y el plegamiento de la proteína recombinante a su estado funcional.

Entre las ventajas de *E. coli* se encuentran el crecimiento rápido, la facilidad de escalado y la disponibilidad de herramientas para controlar la expresión (Rosano & Ceccarelli, 2014). Estas cualidades permiten evaluar construcciones en periodos relativamente cortos y ajustar variables como la cepa, la temperatura, el inductor y el tiempo de cultivo. Sin embargo, una expresión elevada puede superar la capacidad de plegamiento de la célula y provocar la acumulación de proteína insoluble. Los cuerpos de inclusión no necesariamente representan un producto irrecoverable: pueden proteger la proteína frente a la proteólisis y facilitar su separación inicial respecto de otros componentes celulares. El reto consiste en solubilizar los agregados y retirar gradualmente el agente desnaturizante para recuperar una conformación compatible con la función y la inmunogenicidad. En el

caso de proteínas multiepitópicas, este paso es crítico, ya que la recuperación de una banda con el peso esperado no garantiza por sí sola la exposición adecuada de los epítomos.

1.5. Selección de antígenos para el diseño de una vacuna multiepitópica

1.5.1. Formas infecciosas de MPXV y selección de antígenos de superficie

El diseño óptimo de una vacuna multiepitópica del mpox debe considerar la biología del *orthopoxvirus* y la inmunogenicidad de la proteína seleccionada. Como otros poxvirus, el virus mpox presenta dos formas: el EEV y el IMV; mencionadas anteriormente. Estas partículas virales varían en la glicoproteína de superficie y en la composición de la membrana de la envoltura, con los IMV exhibiendo una estructura de membrana simple y los EEV, una doble membrana. Las partículas más abundantes son los IMV, que se acumulan en las células infectadas y pueden liberarse a medida que estas mueren (Tang et al., 2023). Al carecer de una membrana lipídica externa, los IMV son estructuralmente más estables, lo que aumenta su resistencia al daño externo y prolonga su supervivencia fuera del huésped (Schmidt et al., 2011). Mientras que el EEV es frágil y su membrana se rompe fácilmente, liberando partículas infecciosas de IMV. Se ha observado que las proteínas expuestas de los IMV son capaces de desencadenar una mayor producción de anticuerpos neutralizantes y activar las respuestas del complemento. Además, estas proteínas de superficie expuesta mejoran el reconocimiento y la inactivación del MPXV por parte de las células inmunitarias (Law y Smith, 2001). Estudios previos del *orthopoxvirus* han confirmado que L1R, D8L y A28L son dianas de anticuerpos neutralizantes del IMV y las proteínas mencionadas corresponden a M1, E8L y A30L del MPXV, respectivamente (Yang et al., 2024).

La selección de proteínas del IMV responde a su abundancia y estabilidad, pero también a su participación directa en el contacto inicial con la célula huésped. Los anticuerpos capaces de unirse a componentes de adhesión o de fusión pueden obstaculizar etapas previas a la replicación intracelular. En este sentido, la correspondencia funcional entre proteínas de MPXV y homólogos de otros *orthopoxvirus* aporta evidencia para priorizar blancos, aunque no reemplaza la

validación específica. Las diferencias en la secuencia, la exposición superficial y el contexto estructural pueden modificar el reconocimiento. Por ello, el uso conjunto de E8L y A30L busca ampliar el repertorio de determinantes incluidos en el prototipo y evaluar si epítomos derivados de dos proteínas funcionalmente relevantes pueden presentarse de manera eficaz en una sola molécula quimérica.

1.5.2. Proteína E8L

E8L es una proteína de superficie presente en el IMV. Contiene un dominio superficial electropositivo que permite la unión a glicosaminoglicanos (GAG) con carga negativa de las membranas de las células blanco para iniciar la infección (Chadha et al., 2022, Fantini et al., 2022). El carácter electropositivo de E8L no solo facilita la adhesión, sino también puede potenciar el reconocimiento inmunitario (Riswana y Punjungsari, 2022). La región expuesta con carga positiva podría constituir un sitio antigénico accesible para las células B, capaz de estimular la unión de anticuerpos. Esta propiedad fisicoquímica establece un vínculo mecánico entre la entrada viral y la activación inmunitaria, lo que hace que E8L sea adecuada para el diseño de vacunas basadas en epítomos. Diversos estudios *in silico* e inmunoinformáticos han utilizado con éxito proteínas de envoltura expuestas en la superficie similares para identificar epítomos de células B para el desarrollo de vacunas (Attique et al., 2026). Estos precedentes respaldan la justificación para explorar epítomos derivados de E8L como candidatos a vacunas contra el virus de la viruela del mono. La infección iniciada por la unión mediada por E8L desencadena una respuesta inmunitaria adaptativa dominada por la activación de las células B y la producción de anticuerpos. Las células B reconocen epítomos, lo que conduce a la selección clonal y la secreción de anticuerpos. La proteína E8L es conservada en los clados de MPXV y de *Orthopoxvirus* relacionados, lo que sugiere estabilidad estructural y relevancia inmunogénica, por lo que constituye un objetivo prometedor para el diseño de vacunas.

La función de E8L durante la adhesión confiere especial interés a los epítomos localizados cerca de su región de interacción con los glicosaminoglicanos. Si los anticuerpos reconocen una región accesible y funcionalmente importante, podrían interferir por impedimento estérico o competir con la unión a la superficie

celular. La conservación del blanco es igualmente relevante, pues una respuesta dirigida a regiones variables podría perder eficacia frente a otros clados. No obstante, la predicción de antigenicidad y accesibilidad constituye una etapa de selección y no una demostración de neutralización. Para establecer el valor protector de los epítomos, es necesario confirmar el reconocimiento mediante sueros inducidos por la vacuna y, posteriormente, evaluar si dicho reconocimiento se traduce en la inhibición de la infección. El presente diseño se plantea como una plataforma inicial para realizar dicha validación progresiva.

1.5.3. Proteína A30L

La proteína A30L es una proteína estructural conservada de la superficie viral que participa en etapas tempranas de la infección, particularmente en la entrada del virión a la célula huésped, facilitando la fusión con la membrana y la formación de sincitios. Un sincitio es una célula gigante y multinucleada producto de la fusión de varias células. Se considera que esta alteración morfológica facilita la evasión del sistema inmunológico y la propagación viral (Jessie y Dobrovoly, 2022). Distintos análisis bioinformáticos han identificado regiones de A30L con alta antigenicidad (Aktas et al., 2025), con posible capacidad de inducir respuestas de linfocitos B y T. Por esta razón, A30L ha sido incluida en múltiples diseños racionales de vacunas multiepitópicas junto con otras proteínas de superficie (Wang et al., 2025). Además, estudios recientes han demostrado que las proteínas homólogas de las familias A27/A29/A30 son capaces de inducir anticuerpos neutralizantes y protección frente a *Orthopoxvirus* relacionados, lo que respalda el interés en A30L como componente vacunal (Jia et al., 2026).

1.6. Enfoque del presente proyecto

En este proyecto se diseñó y evaluó la proteína multiepitópica LTB-MPX, que comprende secuencias de las proteínas A30L y E8L del virus de MPX unidas al acarreador LTB. La proteína E8L del virus de la viruela símica participa en la adhesión viral a los gangliósidos de las balsas lipídicas de la membrana plasmática. Su motivo de unión coincide con tres epítomos lineales B expuestos, lo que, en teoría, permite la inducción de anticuerpos neutralizantes. Por tanto, E8L es un

antígeno vacunal prometedor (Fantini, Chahinian, & Yahi, 2022). Por otro lado, A30L es un antígeno asociado a la inducción de respuestas de células T, por lo que se considera un antígeno que podría complementar adecuadamente a E8L en el diseño de vacunas. La proteína LTB se utiliza como acarreador debido a su alta inmunogenicidad y a su capacidad de facilitar la captación de los antígenos mediante su interacción con el gangliósido GM1 (Kim y Kang, 2019).

La construcción integra tres epítopos derivados de E8L y dos de A30L en una proteína recombinante fusionada a LTB. Este planteamiento reúne tres niveles de diseño: selección de blancos virales vinculados a la entrada del IMV, elección de regiones antigénicas específicas y uso de un acarreador capaz de aumentar la presentación inmunológica. El sistema de expresión en *E. coli* se eligió por su rapidez, disponibilidad y potencial de escalamiento. La evaluación del prototipo comprende no solo su producción y recuperación, sino también la determinación de la respuesta humoral inducida en un modelo murino y el reconocimiento de los antígenos virales incluidos.

En conjunto, el proyecto busca aportar evidencia experimental sobre la viabilidad de LTB-MPX como plataforma para la presentación de epítopos contra el MPXV. Más que asumir que todos los componentes seleccionados generarán una respuesta equivalente, el estudio permite identificar qué dianas se reconocen tras la inmunización y qué aspectos del diseño requieren optimización. Esta aproximación es relevante para las vacunas multiepitópicas, ya que su desarrollo suele comenzar con ciclos sucesivos de diseño, expresión, caracterización y evaluación inmunológica. Los resultados obtenidos pueden orientar modificaciones en el número, la secuencia u el orden de los epítopos, así como estudios posteriores sobre la funcionalidad de los anticuerpos, la respuesta celular y la protección en modelos de desafío.

2. Antecedentes

2.1. Vacunas autorizadas y necesidad de plataformas específicas contra MPXV

El MPXV, perteneciente al género *Orthopoxvirus* de la familia Poxviridae, comparte

una elevada homología antigénica con el virus de la viruela (Variola virus), por lo que las vacunas desarrolladas originalmente contra la viruela han demostrado conferir protección cruzada frente a la infección por MPXV (Deputy et al., 2023). Se estima que la vacunación contra la viruela proporciona aproximadamente un 85 % de protección frente a mpox, debido a la conservación de múltiples proteínas estructurales entre ambos virus. Sin embargo, tras la erradicación mundial de la viruela en 1980 y la suspensión de los programas de vacunación, la inmunidad poblacional frente a los *Orthopoxvirus* disminuyó considerablemente, lo que favoreció la reemergencia de brotes de mpox en distintas regiones del mundo (Lu et al., 2023).

Actualmente existen vacunas autorizadas, como las derivadas del virus vaccinia atenuado, que han demostrado ser eficaces para reducir la gravedad de mpox. No obstante, estas vacunas presentan diversas limitaciones relacionadas con su disponibilidad, costo, posibles efectos adversos y el empleo de virus vivos o replicativos, que son de especial preocupación en individuos inmunocomprometidos (Gruber, 2022; Kandeel, 2023). Estas limitaciones han impulsado el desarrollo de nuevas plataformas vacunales más seguras, específicas y escalables, entre las que destacan las vacunas recombinantes, de ácidos nucleicos y multiepitópicas.

El brote de mpox de 2022 ha acelerado considerablemente el desarrollo de vacunas específicas contra MPXV. Si bien se ha observado una protección cruzada conferida por vacunas derivadas del virus vaccinia, las investigaciones recientes se han enfocado en identificar antígenos propios de MPXV capaces de inducir respuestas humorales y celulares más amplias. Como resultado, han surgido plataformas vacunales, entre ellas vacunas de ARNm, de proteínas recombinantes y formulaciones multicomponentes, cuyo objetivo es combinar antígenos provenientes tanto del IMV como del EEV.

2.2. Vacunas multicomponente contra MPXV: evidencia experimental

Uno de los primeros trabajos que reportaron experimentalmente esta estrategia fue el de Zhang et al. (2023), quienes diseñaron una serie de vacunas de ARNm que codificaban diferentes combinaciones de las proteínas M1R, E8L, A29L, A35L y

B6R. Los autores demostraron que las formulaciones que integraban múltiples antígenos inducían títulos significativos de anticuerpos neutralizantes, además de respuestas celulares con predominio Th1 y protección frente al desafío con virus de vaccinia en ratones. Estos resultados respaldaron la necesidad de combinar antígenos derivados de las dos formas infectivas del virus (IMV y EVV), en lugar de utilizar inmunógenos individuales.

Posteriormente, Tai et al. (2025) ampliaron este concepto mediante un cribado sistemático de proteínas de superficie de MPXV. Su estudio identificó doce antígenos —A21, A29, M1, H3, A17, A30, A28, H2, I2, G2, A35 y B6— con capacidad neutralizante y demostró que la incorporación simultánea de múltiples proteínas incrementaba significativamente la protección conferida por vacunas de ARNm. Además, desarrollaron un inmunógeno enriquecido en epítopos de linfocitos T (MPX-EPs), demostrando que la combinación de inmunidad humoral y celular proporcionaba una protección superior frente al desafío viral. Estos resultados ponen de manifiesto que el éxito de una vacuna contra MPXV depende no solo de la inducción de anticuerpos neutralizantes, sino también de una activación adecuada de la respuesta celular.

Aunque las vacunas de ARNm representan una de las estrategias más prometedoras, no están exentas de ciertas limitaciones. Principalmente, estas exigen temperaturas de almacenamiento ultracongeladas (entre -90 °C y -60 °C, en algunos casos), lo que dificulta su acceso en regiones en desarrollo. Además, su desarrollo y mantenimiento logístico suelen ser más elevados que los de las vacunas tradicionales con virus atenuados (Ali et al., 2021). Con frecuencia requieren esquemas de refuerzo continuos para mantener niveles óptimos de inmunidad frente a nuevas variantes. Recientemente ha aumentado el interés en el desarrollo de vacunas recombinantes basadas en proteínas, debido a su estabilidad, seguridad y facilidad de producción a gran escala.

En este contexto, Yang et al. (2024) evaluaron distintas combinaciones de las proteínas A29, E8, M1, A35 y B6 como candidatos vacunales recombinantes. Los autores observaron que las formulaciones multicomponente inducían respuestas humorales robustas, producción de IFN- γ y anticuerpos neutralizantes persistentes hasta seis meses después de la inmunización. Además, demostraron

que M1 constituye un antígeno indispensable para maximizar la producción de anticuerpos neutralizantes, mientras que A35 desempeña un papel importante en la inducción de la respuesta celular.

Un ejemplo representativo de los desafíos asociados a la validación experimental de candidatos vacunales recombinantes fue reportado por Ahuja et al. (2025), quienes desarrollaron una plataforma vacunal multivalente basada en una proteína autoensamblable de tipo nanocage (NSP-10) fusionada con diferentes antígenos de MPXV y expresada en *E. coli*. Los autores diseñaron tres inmunógenos recombinantes (Mpx-V1, Mpx-V2 y Mpx-V3) con el objetivo de identificar la formulación con las mejores propiedades de expresión, estabilidad e inmunogenicidad. Sin embargo, únicamente Mpx-V3, compuesto por los antígenos E8L y H3L, pudo recuperarse satisfactoriamente para su caracterización y evaluación biológica. El constructo Mpx-V1 presentó una expresión insuficiente para continuar con el procesamiento, mientras que Mpx-V2, aunque se expresó predominantemente en forma de cuerpos de inclusión, no pudo purificarse debido a su fuerte asociación con proteínas bacterianas contaminantes, lo que impidió recuperar una proteína con la pureza necesaria para estudios posteriores. Como consecuencia, ambos candidatos fueron descartados en la etapa de producción y únicamente Mpx-V3 fue sometido a procesos de solubilización, renaturalización y evaluación inmunológica, en los que demostró su capacidad para inducir una respuesta humoral robusta y proporcionar protección frente al desafío con vaccinia y MPXV.

Este trabajo evidencia que la obtención de proteínas recombinantes con potencial vacunal constituye uno de los principales retos en el desarrollo de vacunas de subunidades. Aunque el diseño computacional puede identificar inmunógenos con propiedades teóricas favorables, su producción experimental depende de múltiples factores relacionados con la expresión heteróloga, el plegamiento proteico, la formación de cuerpos de inclusión, la eficiencia de los protocolos de solubilización y renaturalización, así como de la posibilidad de recuperar proteínas estructural y funcionalmente íntegras. En este sentido, el éxito en la obtención de un candidato vacunal no depende únicamente de la selección de los antígenos, sino también de la viabilidad del proceso de producción.

2.3. Diseño inmunoinformático de vacunas multiepitópicas

Los avances en inmunoinformática y vacunología reversa logrados en la última década han permitido el desarrollo de vacunas basadas en epítomos específicos capaces de inducir respuestas humorales y celulares específicas (Khan et al., 2022). Las vacunas multiepitópicas tienen la capacidad de ampliar la cobertura inmunológica, concentrando la respuesta en los epítomos protectores a la vez que se excluyen los inmunodominantes no protectores y favoreciendo la generación de memoria inmunológica (Maleki et al., 2022).

Entre sus principales ventajas destacan la ausencia de material infeccioso, una mayor seguridad, la posibilidad de incorporar epítomos altamente conservados entre distintas variantes virales y la facilidad para modificar el diseño conforme surgen nuevas cepas. Asimismo, estas vacunas permiten eliminar regiones potencialmente alergénicas o de baja inmunogenicidad, optimizando la respuesta inducida por el inmunógeno (Rcheulishvili et al., 2023).

Diversos grupos de investigación han empleado herramientas bioinformáticas para diseñar candidatos vacunales multiepitópicos frente a MPXV, evaluando parámetros como la antigenicidad, la estabilidad estructural, la cobertura poblacional, la interacción con receptores inmunitarios y la inmunogenicidad mediante simulaciones computacionales (Ahmad et al., 2026; Attique et al., 2026; Rcheulishvili et al., 2023; Singh et al., 2022).

Uno de los primeros trabajos fue desarrollado por Swetha et al. (2022), quienes diseñaron un candidato vacunal multiepitópico utilizando herramientas de inmunoinformática para seleccionar epítomos conservados de distintas proteínas estructurales del virus. Posteriormente, evaluaron las propiedades fisicoquímicas del inmunógeno, realizaron modelado tridimensional, estudios de interacción con receptores tipo Toll y simulaciones de respuesta inmune, y concluyeron que la proteína diseñada presentaba características favorables para inducir una respuesta protectora.

De manera similar, Ramprasad et al. (2023) desarrollaron un inmunógeno multiepitópico mediante vacunología reversa e incorporaron análisis adicionales de dinámica molecular para evaluar la estabilidad estructural del constructo. Sus

resultados mostraron una elevada antigenicidad y una interacción estable con receptores inmunitarios, lo que respalda el potencial de estas estrategias para el desarrollo de vacunas contra MPXV.

Aunque estos estudios han mostrado resultados prometedores, la gran mayoría permanece en la fase *in silico* y existe un número limitado de trabajos que validen experimentalmente dichos diseños mediante producción recombinante y evaluación inmunológica.

2.4. Brecha de validación experimental y fundamento de LTB-MPX

Desde el brote internacional en 2022¹, se ha observado un incremento considerable en el número de estudios centrados en el desarrollo de vacunas específicas contra MPXV. La mayoría de estas investigaciones emplea herramientas de inmunoinformática para identificar epítomos B y T, diseñar proteínas quiméricas, evaluar propiedades fisicoquímicas, realizar análisis estructurales y predecir la interacción con receptores del sistema inmune (Swetha et al, 2022; Yang et al., 2024;).

Sin embargo, una limitación recurrente de estos trabajos es que la validación experimental sigue siendo escasa. Son escasos los estudios que han logrado expresar las proteínas diseñadas, purificarlas y evaluar su capacidad para inducir respuestas inmunológicas en modelos animales. En consecuencia, es necesario desarrollar plataformas experimentales que permitan corroborar las predicciones bioinformáticas y avanzar hacia candidatos vacunales con potencial de aplicación clínica.

En este contexto, el desarrollo de la proteína quimérica LTB-MPX, integrada por epítomos derivados de las proteínas E8L y A30L fusionados a LTB, representa una estrategia orientada a contribuir a la validación experimental de vacunas multiepitópicas frente al MPXV mediante su producción, purificación y evaluación de su inmunogenicidad.

3. Justificación

La mpox, enfermedad causada por un ortopoxvirus zoonótico emergente, ha adquirido relevancia internacional tras su reemergencia y diseminación fuera de las regiones tradicionalmente endémicas, lo que ha evidenciado su capacidad para generar brotes y constituir un problema de salud pública. Aunque las vacunas basadas en el virus vaccinia proporcionan protección cruzada contra el MPXV, su disponibilidad es limitada y algunas presentan restricciones asociadas con su perfil de seguridad. Además, al haberse desarrollado originalmente contra la viruela, no fueron diseñadas específicamente con antígenos propios de MPXV. Por ello, resulta pertinente explorar nuevas estrategias vacunales que permitan inducir respuestas inmunitarias dirigidas contra componentes específicos del virus.

En este contexto, las vacunas multiepitópicas representan una alternativa prometedora, ya que permiten integrar en una misma construcción diferentes secuencias antigénicas seleccionadas y producirlas mediante sistemas recombinantes accesibles. Este enfoque puede favorecer el desarrollo de formulaciones específicas, seguras y optimizables. Por tanto, la producción y evaluación inmunológica de la proteína quimérica LTB-MPX, constituida por epítomos de las proteínas E8L y A30L fusionados a LTB como acarreador, permitirá generar evidencia experimental sobre el potencial de esta plataforma para inducir respuestas humorales específicas y contribuir al desarrollo futuro de vacunas de subunidad contra la mpox.

4. Hipotesis

La proteína quimérica LTB-MPX será capaz de expresarse y recuperarse en *E. coli* y, tras su administración por vía subcutánea en un modelo murino, inducirá una respuesta humoral específica contra el constructo y los antígenos derivados de MPXV incluidos en su diseño.

5. Objetivos

5.1. Objetivo General

Evaluar la inmunogenicidad en un modelo murino de la proteína quimérica LTB-MPX, basada en un acarreador y en secuencias del virus de la viruela símica, en

términos del curso temporal y tipo de respuesta inmune humoral inducida bajo un esquema de vacunación parenteral, con la finalidad de determinar su potencial para el desarrollo de un prototipo de vacuna de subunidad.

5.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar *in silico* el diseño de la proteína quimérica LTB-MPX mediante la predicción de sus propiedades fisicoquímicas, la solubilidad, la estabilidad, la estructura tridimensional y la antigenicidad.
- Obtener la proteína quimérica LTB-MPX en *E. coli* recombinante mediante protocolos de expresión, solubilización con agentes caotrópicos y renaturalización mediante diálisis.
- Evaluar la capacidad de la proteína quimérica LTB-MPX para inducir respuestas humorales sistémicas de IgG en ratones tras su administración mediante un esquema de inmunización por vía subcutánea.
- Caracterizar el perfil de la respuesta inmune inducida por la proteína LTB-MPX mediante la determinación de las subclases de IgG, a fin de evaluar el equilibrio Th1/Th2.
- Analizar la persistencia de la respuesta humoral inducida por la proteína LTB-MPX mediante la cuantificación de los niveles de IgG específicas a los 3 meses posteriores a la finalización del esquema de inmunización.

6. Metodología

6.1. Validación bioinformática del diseño de LTB-MPX

La secuencia de aminoácidos de LTB-MPX se analizó mediante diversas herramientas bioinformáticas. Sus propiedades fisicoquímicas, incluyendo peso molecular, punto isoelectrico, composición de aminoácidos, coeficiente de extinción, vida media, índice de inestabilidad e índice alifático, así como el valor

GRAVY, se determinaron mediante ProtParam. La predicción de la estructura de la proteína se realizó mediante los programas en línea AlphaFold y UCSF ChimeraX, versión 1.12. Adicionalmente, se evaluaron la antigenicidad, la solubilidad y el potencial alergénico del constructo utilizando VaxiJen v2.0., Scratch Protein Predictor y AllergenFP v1.0, respectivamente. Los resultados se interpretaron de acuerdo con los algoritmos y los valores de corte establecidos por cada plataforma.

6.2. Expresión de proteína LTB-MPX en *E. coli*

Para la expresión de la proteína recombinante LTB-MPX se utilizó la cepa *E. coli* Rosetta (DE3) previamente transformada con el vector de expresión pET-15b-MPXe. Se preparó un preinóculo con 25 mL de medio LB adicionando los antibióticos ampicilina (100 µg/ml) y cloranfenicol (40 µg/ml). En condiciones estériles, se inoculó con una asada de colonias previamente seleccionadas y cultivadas en una placa de agar LB. Se dejó crecer por 24 h a 37 °C con agitación a 180 rpm. Para inocular, en cuatro matraces de 500 mL se agregaron 10% de preinóculo, 250 mL de medio LB estéril suplementado con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37 °C a 180 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (OD_{600nm}) de 0,6-0,7. Una vez alcanzado el valor deseado, se indujo con lactosa a una concentración de 1,5 g/L. Los cultivos inducidos se incubaron durante 16 h a 30 °C con agitación constante.

6.3. Extracción de LTB-MPX

Las células se recolectaron por centrifugación (7000 × *g*, 15 min, 4 °C) y se resuspendieron en 0,2 mL de tampón de extracción (100 mM de Tris, 20 % de sacarosa y pH 7,3) por cada 20 mg de biomasa. Las células se recuperaron mediante centrifugación ((7000 × *g*, 15 min, 4 °C) El sedimento se resuspendió en agua inyectable (0,5 mL por cada 20 mg de biomasa, 4 °C La lisis celular se realizó mediante sonicación (9 pulsos de 30 s con intervalos de 30 s de descanso y amplitud del 70 %) sobre hielo. Las fracciones solubles e insolubles se separaron por centrifugación (7000 × *g*, 15 min), y las proteínas se analizaron mediante SDS-PAGE (12 %). Se procesaron cultivos no inducidos en paralelo como controles negativos.

6.4. Análisis de LTB-MPX por SDS-PAGE

Las fracciones proteicas se analizaron mediante SDS-PAGE (12 %) en condiciones reductoras. Las muestras se mezclaron con tampón de carga 5× (312,5 mM de Tris-HCl, pH 6,8, 50 % de glicerol, 5 % de SDS, 0,05 % de azul de bromofenol, 100 mM de DTT), se hirvieron a 95 °C durante 10 minutos y se cargaron en los geles (30 µL por carril). Al finalizar la electroforesis, los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250.

6.5. Purificación de LTB-MPX

La fracción proteica insoluble se lavó dos veces con PBS 1× que contenía un 1 % (v/v) de Triton X-100, dos veces con PBS 1× y una vez con fosfato 20 mM, urea 4 M y pH 7,1 para eliminar los restos celulares y las proteínas contaminantes. Después de cada lavado, el sobrenadante se sometió a ultrasonidos (dos pulsos de 30 s con intervalos de 30 s de descanso, a una amplitud del 70 %) sobre hielo y se centrifugó (7000 × g, 15 min, 4 °C). El sedimento resultante se resuspendió en tampón de solubilización (20 mM de fosfato, 500 mM de NaCl, 8 M de urea, pH 7,1) y se incubó durante toda la noche a 4 °C. Tras la centrifugación (7000 × g, 15 min), se recogió el sobrenadante que contenía la proteína recombinante solubilizada. Este paso se repitió dos veces. Se recogió el sobrenadante final y se sometió a un proceso de replegamiento mediante diálisis utilizando una membrana tubular de célula de alta retención con un corte de peso molecular (MWCO) de 12,4 kDa (SigmaAldrich). Los tampones utilizados para llevar a cabo el replegamiento, en orden secuencial, fueron: tampón Tris 20 mM + urea 6 M + β-mercaptoetanol 1 mM + 0,01 % (v/v) Tween 20 a pH 8, tampón Tris 20 mM + urea 4 M + β-mercaptoetanol 1 mM + 0,01 % (v/v) Tween 20 + 1 mM de cisteína a pH 8, tampón Tris 20 mM + 2 M de urea + 1 mM de β-mercaptoetanol + 0,01 % (v/v) de Tween 20 a pH 8, tampón Tris 20 mM + 1 mM de β-mercaptoetanol + 0,01 % (v/v) Tween 20 a pH 8, y 10 % (p/v) de sacarosa + 0,01 % (v/v) de Tween 20 + 1 mM de β-mercaptoetanol.

6.6. Cuantificación por densitometría

Las muestras de proteína se cuantificaron mediante densitometría con el programa

ImageJ, a partir de una curva de calibración de albúmina sérica bovina (BSA) en el intervalo de 100 a 400 µg/mL, con incrementos de 50 µg/mL. Primero, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% para analizar las muestras de proteína antes y después de la diálisis.

6.7. Detección de antigenicidad por Western Blot

La antigenicidad del LTB-MPX purificado se evaluó mediante Western blot. Después de la SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Sigma-Aldrich) utilizando un tampón de transferencia (39 mM de glicina, 48 mM de Tris, 0,037 % de SDS, 20 % de metanol) a 500 mA durante 60 minutos. Durante el ensayo de inmunodetección, se realizaron tres lavados con PBS-T (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 4,3 mM de Na₂HPO₄ y 0,05 % (v/v) de Tween-20) entre cada paso. Las membranas se bloquearon durante toda la noche a 4 °C con leche descremada al 5 % en PBS (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl y 4,3 mM de Na₂HPO₄) y se incubaron durante toda la noche a 4 °C con suero hiperinmune de ratón anti-CTB (1:500), seguido de un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (1:2000) durante 2 horas a 25 °C. La unión de los anticuerpos se detectó con el reactivo SuperSignal West Dura (Thermo Scientific, EE. UU.) y se visualizó mediante quimioluminiscencia (iBright FL1000). Se utilizó una proteína del grupo anfitrión que contiene LTB, con un peso molecular de 28 kDa como control positivo, y un extracto proteico total de un cultivo de *E. coli* no inducido sirvió como control negativo.

6.8. Esquema de inmunización

Se evaluó la inmunogenicidad de LTB-MPX en ratones BALB/c (n = 4, de 12 semanas de edad) según un protocolo aprobado (CEID2023-03-R1). Se establecieron tres grupos experimentales (Tabla 1), cada uno conformado por cuatro ratones, a los cuales se les administró, por vía subcutánea (s.c.), el tratamiento establecido en los días 1, 14 y 28. A dos de los grupos se les administró 5 y 10 µg de LTB-MPX más hidróxido de aluminio [Al(OH)₃], o solo el vehículo (10 % de sacarosa, 0,01 % de Tween 20) más Al(OH)₃. Los volúmenes de la dosis fueron de 200 µL. El Al(OH)₃ se utilizó en una proporción de 1:8 (G Biosciences,

EE. UU., n.º de cat. 786-1215).

Tabla 1. Descripción de los grupos experimentales. Los ratones fueron asignados aleatoriamente a los esquemas descritos.

Grupo	Formulación
1	5 µg LTB-MPX + Al (OH) ₃ + Vehículo
2	10 µg LTB-MPX + Al (OH) ₃ + Vehículo
3 (Control)	Al (OH) ₃ + Vehículo

6.9. Muestras de sangre

Las muestras de sangre se tomaron de todos los grupos de ratones en los días 0, 27, 42 y 118. Se centrifugaron las muestras a 4000 × *g* durante 10 min. Posteriormente, se obtuvo el suero y se congeló a -40 °C para análisis posteriores.

6.10. Detección de anticuerpos

La detección de anticuerpos se confirmó mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). La placa se recubrió con 100 ng/pozo antígeno de interés diluido en tampón de carbonatos (15 mM de Na₂CO₃, 35 mM de NaHCO₃, pH 9,6) y se incubó durante la noche a 4 °C. Cada paso de incubación fue precedido por una serie de lavados con solución PBS 1×. Las placas fueron bloqueadas con una solución de leche en polvo descremada a temperatura ambiente durante dos horas. Posteriormente, se prepararon diluciones 1:500 de los sueros de prueba y se incubaron a 4 °C durante 24 h. Para el marcaje secundario, se utilizó IgG antiraton conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (dilución 1:2000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), seguida de una incubación de 2 h a 25 °C. Finalmente, la reacción se llevó a cabo añadiendo una solución de ABTS, compuesta por 0.6 mM de ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Para su posterior análisis, se midió la absorbancia a 405 nm después de 60 minutos utilizando un lector de microplacas Multiskan™ FC (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

6.11. Conjugados de péptidos con BSA

En un tubo cónico de 1.5 mL se mezclaron 500 µg de BSA en 500 µL de buffer de boratos (50 mM, pH 8.5) con 500 µL de péptido (1 µg/µL) en el mismo buffer. Posteriormente, se añadieron 50 µL de glutaraldehído al 0,2% y el tubo se agitó suavemente por inversión. La mezcla de reacción se incubó con agitación durante 2 horas a la oscuridad. Transcurrido ese tiempo, se agregaron 50 µL de glicina y se mantuvo la agitación en la oscuridad durante 30 min. Para detener la reacción, la mezcla se colocó en un baño de hielo, y se adicionaron 20 µL de NaBH₄ (1 mg/mL). Finalmente, el producto se dializó contra PBS.

6.12. Determinación de las subclases IgG1 e IgG2a y estimación del perfil Th1/Th2

Para obtener una aproximación al perfil Th1/Th2 de la respuesta humoral inducida por LTB-MPX, se determinaron mediante ELISA indirecto los anticuerpos específicos de las subclases IgG1 e IgG2a. Las placas se sensibilizaron con 100 ng por pozo de la proteína LTB-MPX y se incubaron durante la noche a 4 °C. Posteriormente, se realizaron lavados con PBS-Tween 20 al 0,05 % (PBS-T) y los sitios de unión inespecífica se bloquearon con leche descremada al 5 % durante 2 h a temperatura ambiente.

Después del bloqueo, se añadieron los sueros de los grupos inmunizados y del grupo control en las diluciones evaluadas, y se incubaron bajo las mismas condiciones para ambas subclases. Tras los lavados correspondientes, se adicionaron por separado anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (horseradish peroxidase, HRP) específicos para IgG1 o IgG2a de ratón, ambos a una dilución de 1:2000. La reacción se reveló con ABTS como sustrato cromogénico y la absorbancia se registró a 405 nm. Todas las muestras se analizaron por triplicado técnico.

Para el procesamiento de los resultados, se corrigieron las absorbancias de IgG1 e IgG2a restando la señal del control negativo. Posteriormente, se calculó la relación

entre ambas subclases mediante la ecuación 1.

$$\text{Relación } \frac{IgG2a}{IgG1} = \frac{\text{Absorbancia corregida de IgG2a}}{\text{Absorbancia de corregia de IgG1}} \quad (1)$$

7. Resultados

7.1. Caracterización bioinformática

El análisis fisicoquímico *in silico* de LTB-MPX (Tabla 2) mostró una distribución prácticamente equilibrada de residuos cargados, con 20 aminoácidos de carga negativa y 19 de carga positiva. La proteína presentó una vida media estimada superior a 10 horas en *E. coli*, lo que sugiere una estabilidad intracelular favorable frente a la degradación. No obstante, el índice de inestabilidad fue de 46,62, un valor superior al umbral de 40, por lo que la proteína se clasificó como potencialmente inestable *in vitro*. Por otra parte, el índice alifático de 73,08 sugirió una estabilidad térmica moderada, mientras que el valor de GRAVY de -0,32 indicó un carácter predominantemente hidrofílico. Aunque esta propiedad puede favorecer la interacción con el medio acuoso, no garantiza la expresión soluble de la proteína, ya que la formación de cuerpos de inclusión también depende de factores estructurales y de las condiciones de producción. En conjunto, los resultados respaldan la viabilidad fisicoquímica del diseño, aunque señalan la necesidad de evaluar experimentalmente su estabilidad y solubilidad.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de LTB-MPX

Propiedad	Valor
Longitud	211 aa
PM	22, 95 Da
Punto isoeléctrico teórico (pI)	6,43
Residuos cargados negativamente (Asp + Glu)	20

Residuos cargados positivamente (Arg + Lys)	19
Índice de estabilidad	46,62
Índice alifático	73,08
GRAVY (Índice de hidropatía promedio)	-0,32
Vida media	10 h

La proteína LTB-MPX tiene una longitud de 211 aminoácidos, un peso molecular de 22,95 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 6,43. El modelado estructural de la proteína recombinante se realizó con AlphaFold y UCSF ChimeraX, versión 1.12 (Meng et al., 2023) (Fig. 2), lo que reveló que el dominio LTB (azul rey) mantiene su estructura secundaria característica, mientras que los epítomos diana (segmento rosa, azul claro, amarillo, verde y rojo) se distribuyen espacialmente a lo largo de la proteína. Las regiones de conexión (en negro y gris) aseguraron la unión adecuada de los epítomos sin alterar el patrón general de plegamiento, lo que sugiere que la proteína quimérica conserva su estabilidad estructural. La caracterización bioinformática del constructo diseñado LTB-MPX indicó una alta antigenicidad (0,91) y, según Scratch Protein Predictor, se predijo que la proteína se acumularía

en la fracción insoluble (probabilidad = 0,76). Además, AllergenFP v.1.0 predijo un bajo potencial alergénico.

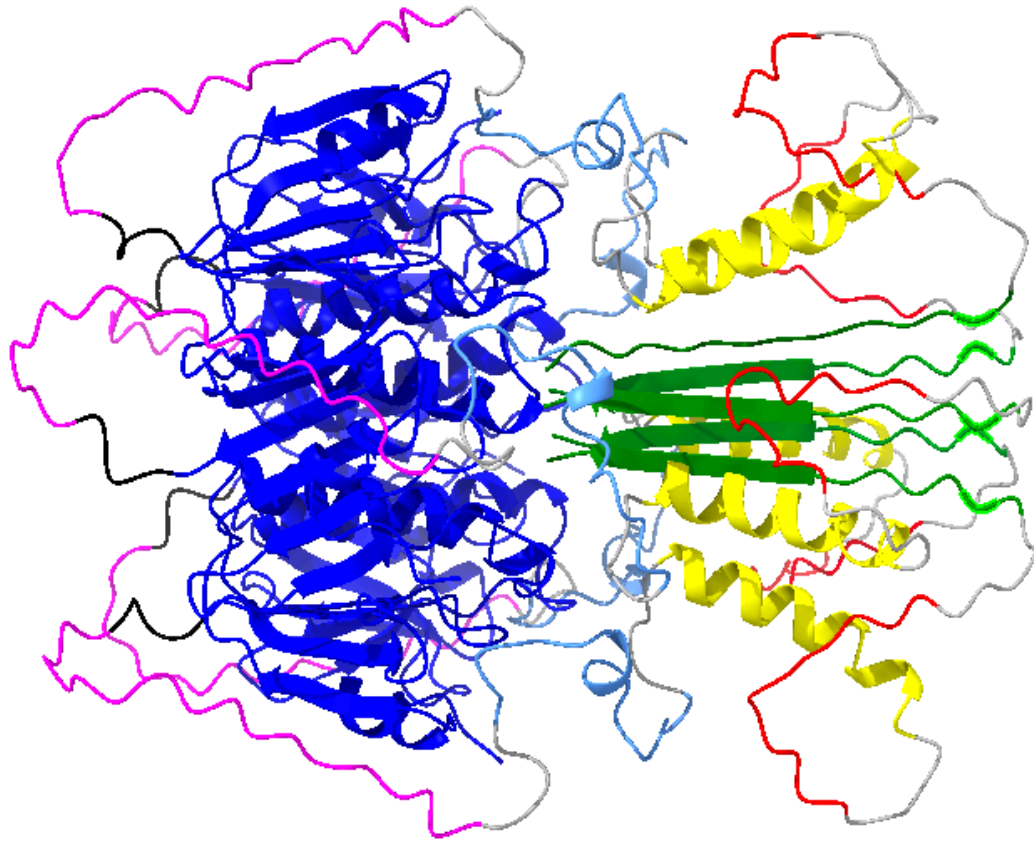


Figura 2. Modelado molecular de la proteína LTB-MPX en Chimera. Se destacan los siguientes elementos: LTB (en azul), los epítomos diana separados por un enlazador de 5 aminoácidos (en gris) y los epítomos diana de A30L (en rojo y verde) y de E8L (en rosa, azul claro y amarillo).

7.2. LTB-MPX se expresa en forma de cuerpos de inclusión

Se utilizó *E. coli* como huésped de expresión debido a su capacidad para producir

proteínas de manera rápida y rentable, así como a la existencia de un marco regulatorio sólido, lo que facilita su posible transferencia a la evaluación clínica (Rosano & Ceccarelli, 2014). La expresión de la LTB-MPX se evaluó mediante 1,5 g/L de lactosa, con un tiempo de inducción de 16 h a 30 °C. Estas condiciones se seleccionaron con base en un estudio preliminar en el que se analizaron los efectos de diferentes temperaturas y concentraciones de inductor sobre los rendimientos de proteína recombinante.

La predicción de la solubilidad de la proteína LTB-MPX se realizó con la herramienta bioinformática Scratch Protein Predictor, la cual reveló que la proteína de interés tendería a ser insoluble. El análisis de los resultados de la SDS-PAGE reveló la presencia de una proteína predominante de 22,95 kDa en la fracción insoluble (Figura 3), mientras que esta banda estaba ausente en la fracción de proteínas solubles, lo que indica que la proteína recombinante se acumula en forma de cuerpos de inclusión, lo cual concuerda con la predicción obtenida mediante Scratch Protein Predictor.

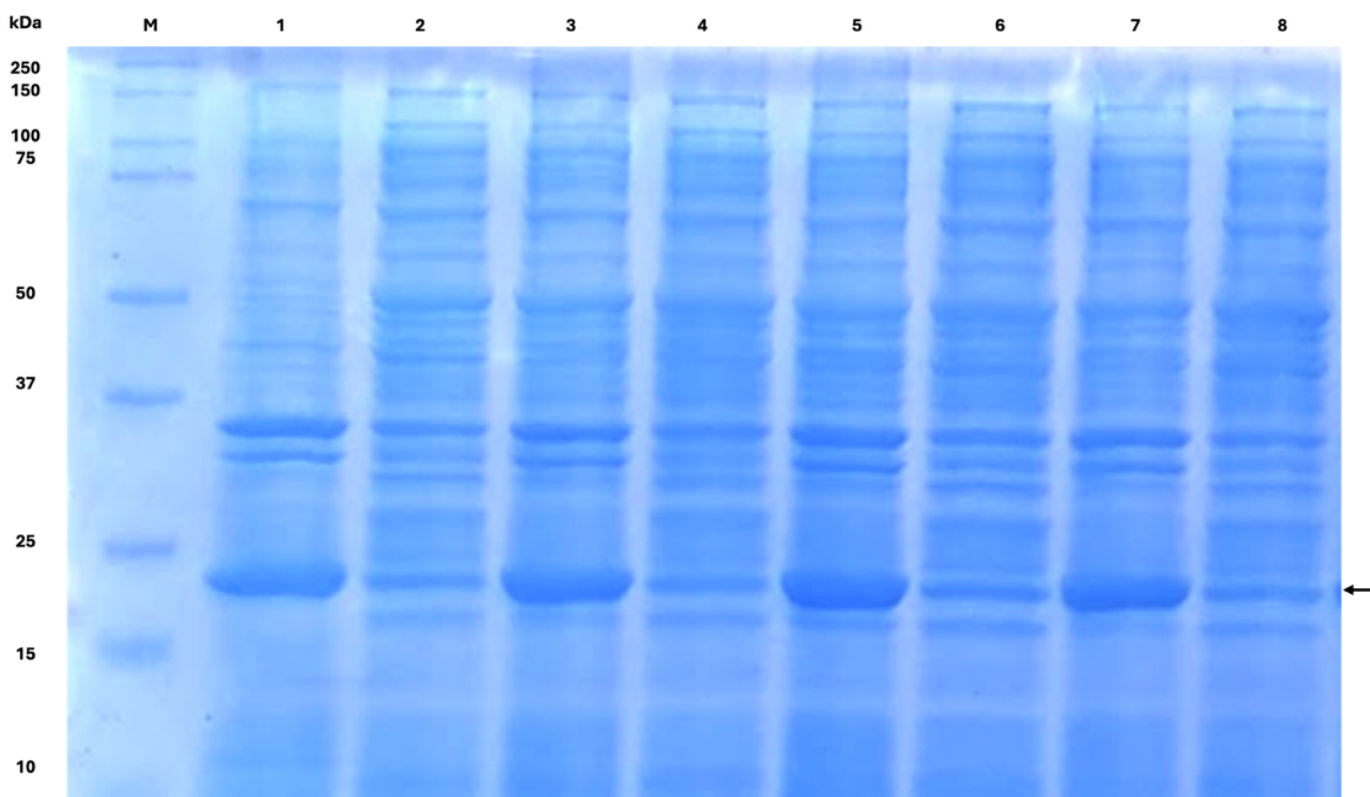


Figura 3. Análisis por SDS-PAGE de extractos proteicos de cultivos de 1 L que expresan LTB-MPX. Carriles: M, marcador de peso molecular en kDa (Kaleidokope BIO-RAD); 1-2, control no inducido; 2, 4, 6, 8, fracciones proteicas solubles; y 3, 5, 7, fracciones proteicas insolubles de la fase posterior a la inducción. La flecha negra indica el peso molecular esperado de la proteína LTB-MPX (~22,95 kDa).

7.3. El LTB-MPX se puede purificar y replegar con éxito

Se estableció con éxito un método para lograr la purificación y el replegamiento de la proteína LTB-MPX sin necesidad de cromatografía, que consistió en seis etapas de lavado con soluciones de concentración creciente del agente caotrópico, lo que permitió la solubilización completa de la proteína objetivo (Figura 4A). Curiosamente, este enfoque permitió obtener fracciones de alto grado de pureza; por lo tanto, la fracción 6 se sometió a un proceso de replegamiento mediante diálisis, lo que permitió recuperar una proteína cuya pureza superaba el 90 % (Figura 4B). Cabe destacar que esto se logró sin necesidad de recurrir a la

cromatografía.

A)

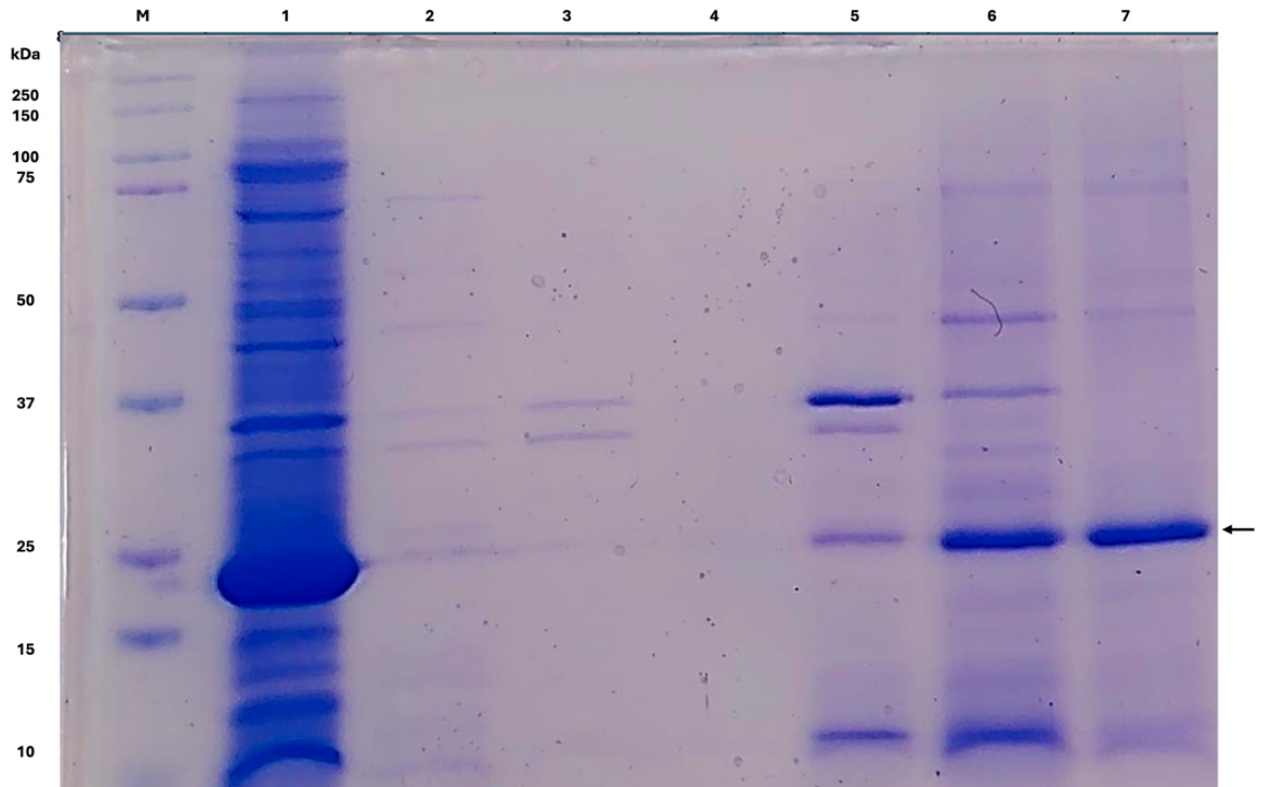


Figura 4. Purificación y cuantificación de la proteína LTB-MPX. (A) Los cuerpos de inclusión recuperados de cultivos a escala de 1 L se solubilizaron con agentes caotrópicos y se analizaron mediante SDS-PAGE. Carriles: M, marcador de peso molecular en kDa (Kaleidokope BIO-RAD); 1, proteína LTB-MPX en cuerpos de inclusión; 2, proteína LTB-MPX recuperada del sobrenadante de la primera etapa de solubilización con PBS 1× que contenía un 1 % (v/v) de Triton X-100; 3, proteína LTB-MPX recuperada del sobrenadante de la segunda etapa de solubilización con PBS 1× que contenía un 1 % (v/v) de Triton X-100; 4, proteína LTB-MPX recuperada del sobrenadante de la tercera etapa de solubilización con PBS 1×; 5, proteína LTB-MPX recuperada del sobrenadante de la cuarta etapa de solubilización con PBS 1×; 6, proteína LTB-MPX recuperada del sobrenadante de la quinta etapa de solubilización con fosfato 20 mM, urea 4 M y pH 7,1; 7, proteína LTB-MPX recuperada del sobrenadante de la sexta etapa de solubilización con 20

mM de fosfato, 500 mM de NaCl, 8 M de urea, pH 7,1

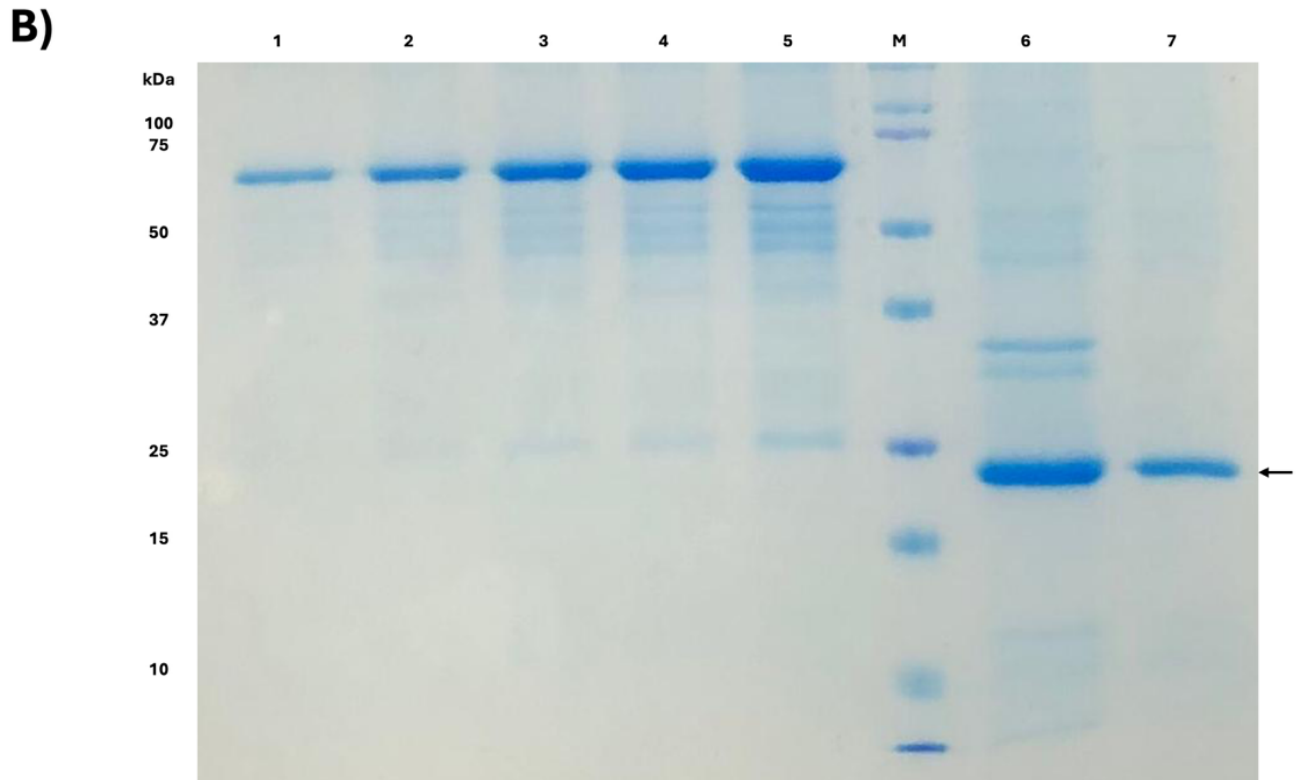


Figura 4. Purificación y cuantificación de la proteína LTB-MPX. **(B)** Cuantificación de la LTB-MPX mediante densitometría tras las etapas de replegamiento en un gel de SDS-PAGE al 12 % teñido con azul de Coomassie. Carriles: 1-5, curva estándar de BSA; M, marcador de peso molecular en kDa; 7, proteína LTB-MPX antes del replegamiento; 8, LTB-MPX después del replegamiento. La flecha negra indica el tamaño esperado de la proteína LTB-MPX (~22,95 kDa).

Utilizar el método de diálisis permitió obtener lotes de proteína pura a concentraciones de hasta 287,59 $\mu\text{g/mL}$, lo que representa un rendimiento de 3,72 mg de proteína LTB-MPX replegada por litro de cultivo. Se comprobó la antigenicidad de la proteína mediante Western blot con anticuerpo secundario anti-

CTB (Figura 5).

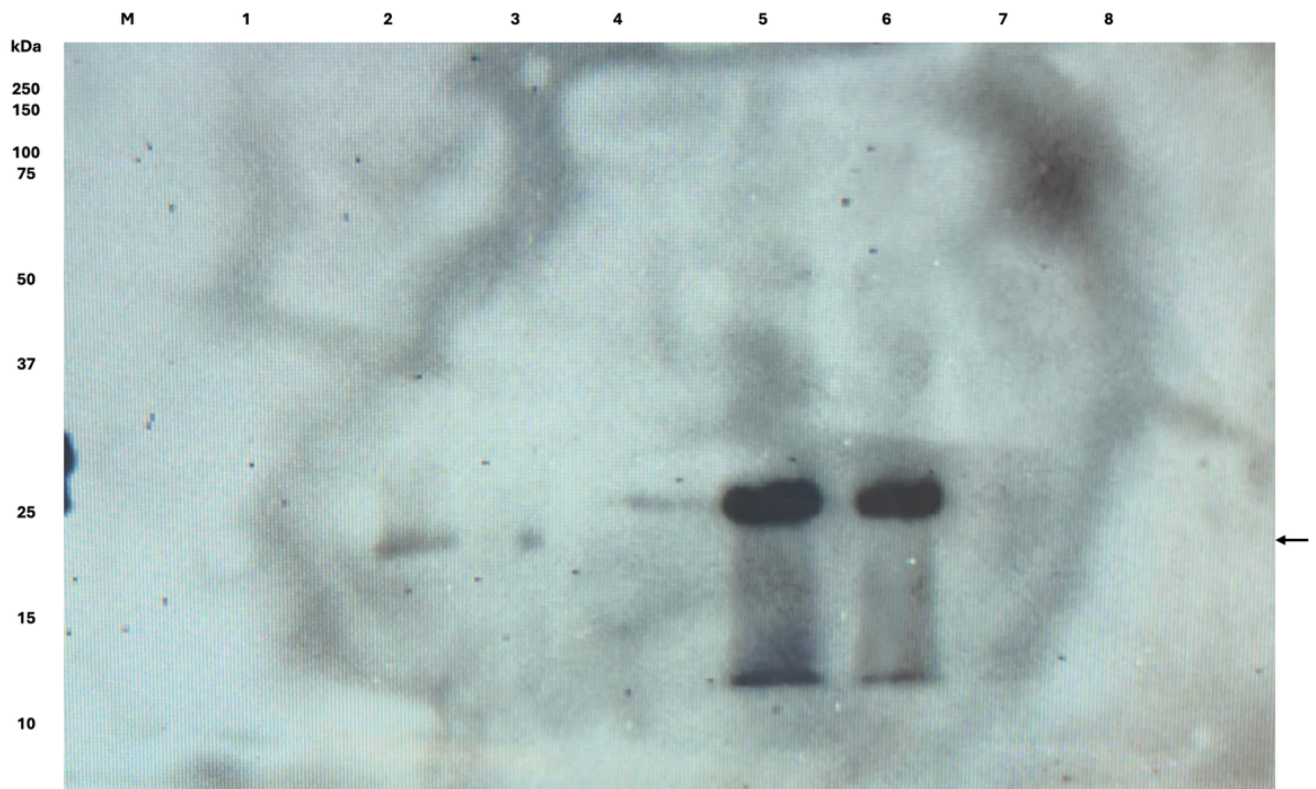


Figura 5. Evaluación de la antigenicidad de LTB-MPX. Se realizó un análisis de Western blot utilizando anticuerpos anti-CTB como marcaje primario. Carriles: M, marcador de peso molecular en kDa; 1, control negativo (proteína no relacionada); 2, proteína LTB-MPX; 3-4, pocillos vacíos; 5-6, proteína no relacionada que porta la secuencia de LTB como control positivo (~22,95 kDa, 100 ng); 7-8, pocillos vacíos. La flecha negra indica el tamaño esperado de la proteína LTB-MPX (~22,95 kDa).

7.4. El LTB-MPX induce respuestas humorales en ratones

7.4.1. Respuesta inmune frente al antígeno LTB-MPX

Se evaluó la inmunogenicidad de LTB-MPX en ratones BALB/c mediante un esquema de inmunización con tres dosis subcutáneas. Las mediciones de los niveles de IgG anti-LTB confirmaron la inducción de respuestas significativas en comparación con el grupo de control ($p < 0,05$), sin que se observaran diferencias significativas entre los dos niveles de dosis de antígeno después de la tercera

inmunización (Figura 6).

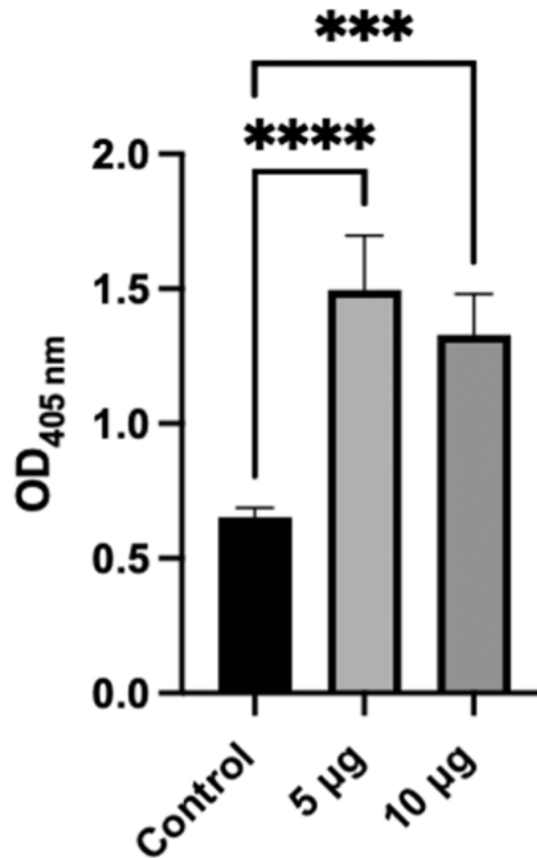


Figura 6. Respuesta sistémica de IgG inducida por LTB-MPX en ratones de prueba. Se inmunizó a los ratones por vía subcutánea con LTB-MPX en un esquema de tres dosis y se tomaron muestras de suero después de la última dosis de refuerzo para realizar pruebas de ELISA con LTB-MPX como antígeno diana, con una dilución de 1:500. Las barras de error representan la desviación estándar del valor medio de absorbancia (n=4). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Los asteriscos indican diferencias significativas *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ respecto al grupo de control (vehículo).

7.4.2. Respuesta inmune frente a los antígenos diana de mpox

Para determinar si la proteína recombinante LTB-MPX indujo anticuerpos específicos contra las proteínas A30L y E8L, se midieron los títulos de IgG séricos mediante ELISA indirecto en placas recubiertas con A30L y E8L. Los resultados muestran que hubo una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo inmunizado con LTB-MPX en la medición de los anticuerpos de unión a E8L (Figura 7A), mientras que no se observó una respuesta significativa frente a la proteína A30L (Figura 7B).

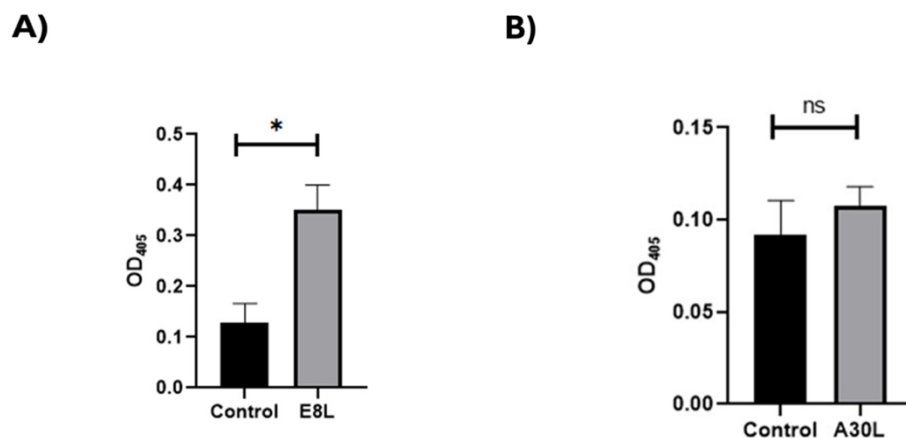


Figura 7. Respuesta sistémica de IgG inducida por LTB-MPX en ratones de prueba frente a los antígenos diana de mpox. Se inmunizó a los ratones por vía subcutánea con LTB-MPX en un esquema de tres dosis y se tomaron muestras de suero después de la última dosis de refuerzo para realizar pruebas de ELISA con las proteínas E8L (A) y A30L (B) como antígenos diana. Las barras de error representan la desviación estándar del valor medio de la absorbancia (n=4). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. El asterisco indica una diferencia significativa * $p < 0,05$ respecto al grupo de control (vehículo), mientras que ns indica que no hay diferencia.

7.4.3. Respuesta inmune frente a péptidos sintéticos

Para confirmar que la respuesta humoral estaba dirigida a los epítomos de interés y no únicamente a la proteína quimérica completa, se sintetizaron péptidos representativos de las secuencias seleccionadas y se evaluó su reconocimiento por los sueros de los animales inmunizados. Los péptidos sintéticos libres presentaron baja reactividad en ELISA, probablemente debido a su reducido tamaño molecular y a la limitada adsorción a la placa (Figura 8).

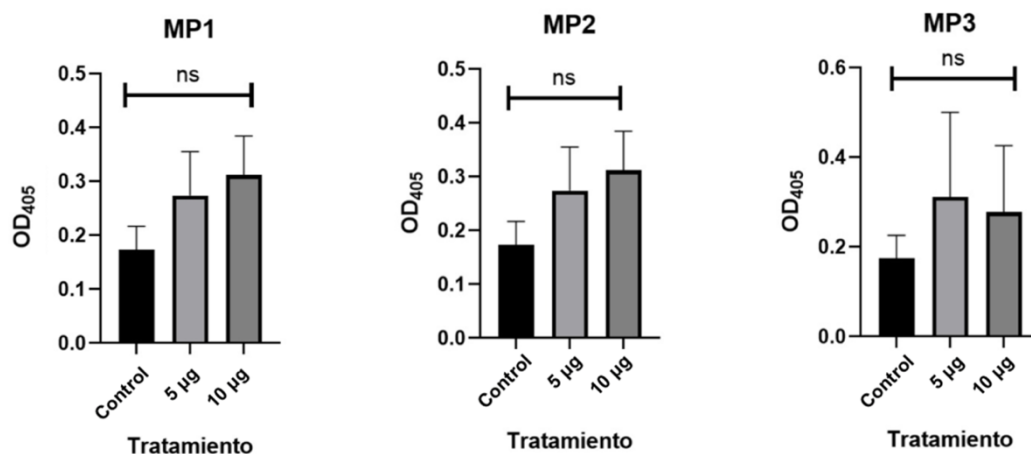


Figura 8. Respuesta sistémica de IgG inducida por LTB-MPX en ratones de prueba frente a péptidos sintéticos. Se inmunizó a los ratones por vía subcutánea con LTB-MPX en un esquema de tres dosis y se tomaron muestras de suero tras la última dosis de refuerzo para realizar pruebas de ELISA con los péptidos MP1, MP2 y MP3 como antígenos diana. Las barras de error representan la desviación estándar del valor medio de la absorbancia (n=4). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. El “ns” indica que no hay diferencia significativa ($p > 0,05$) respecto al grupo de control (vehículo).

7.4.4. Respuesta inmune frente a antígeno LTB-MPX utilizando IgG1 e IgG2a como anticuerpo secundario

Con la finalidad de obtener una aproximación al perfil Th1/Th2 de la respuesta humoral inducida por LTB-MPX, se evaluó mediante ELISA la presencia de anticuerpos específicos de las subclases IgG1 e IgG2a. Se detectó señal en ambas subclases; sin embargo, la absorbancia de IgG1 fue mayor que la de IgG2a (Figura 9). A partir de las absorbancias corregidas respecto al control, se obtuvo una relación IgG2a/IgG1 de 0,12, lo que indica un predominio de IgG1 y sugiere una respuesta humoral principalmente asociada a un perfil Th2. No obstante, la detección de IgG2a demuestra que la inmunización también indujo un componente asociado a Th1. Por lo tanto, LTB-MPX produjo una respuesta humoral mixta, aunque con predominio del perfil Th2.

Respuesta de IgG1 e IgG2a

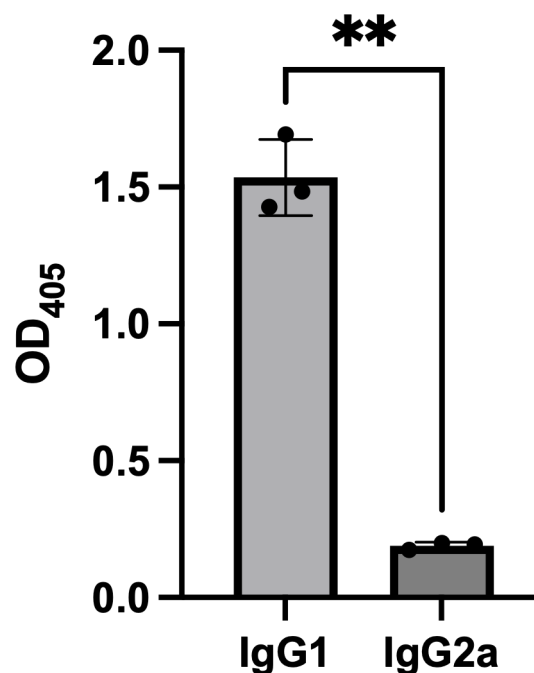


Figura 9. Respuesta sistémica de IgG inducida por LTB-MPX en ratones evaluando respuesta Th1/Th2. Se inmunizó a los ratones por vía subcutánea con LTB-MPX en un esquema de tres dosis y se tomaron muestras de suero después de la última dosis de refuerzo para realizar pruebas ELISA utilizando LTB-MPX como antígeno diana, con una dilución de 1:500, IgG1 e IgG2a a dilución de 1:2000 como anticuerpo secundario. Las barras de error representan la desviación estándar del valor medio de la absorbancia (n=3). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Los asteriscos $^{**}p < 0,01$ indican una diferencia significativa entre IgG1 e IgG2a.

7.4.5. Evaluación de la respuesta inmune frente al antígeno LTB-MPX, tres meses después de la última inmunización

Por último, se analizaron los sueros obtenidos tres meses después de la última inmunización mediante ELISA con LTB-MPX como antígeno. Los sueros recolectados 3 meses después de la última inmunización mantuvieron una respuesta humoral detectable frente a LTB-MPX, lo que sugiere la persistencia de anticuerpos específicos (Figura 10).

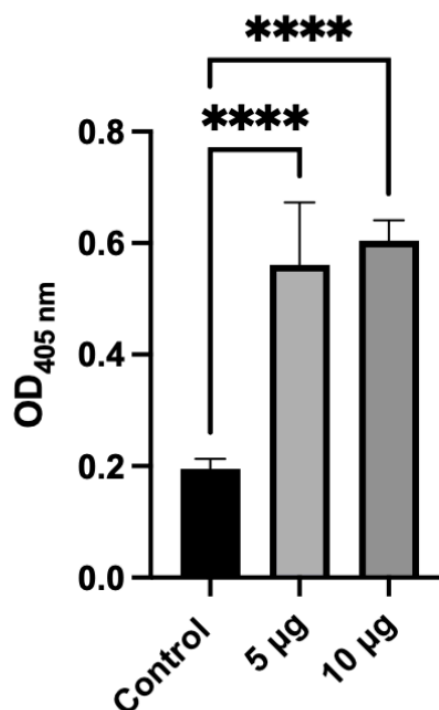


Figura 10. Respuesta sistémica de IgG inducida por LTB-MPX tres meses después de la última inmunización. Se inmunizó a los ratones por vía subcutánea con LTB-MPX en un esquema de tres dosis y se tomaron muestras de suero tres meses después de la última dosis de refuerzo para realizar pruebas ELISA utilizando LTB-MPX como antígeno diana, a una dilución de 1:500. Las barras de error representan la desviación estándar del valor medio de la absorbancia (n=3). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Los asteriscos **** $p < 0,0001$ indican diferencias significativas respecto al grupo de control (vehículo).

7.5. Generación de conjugados de péptidos sintéticos con BSA y evaluación de respuesta inmune

Para mejorar la presentación antigénica de los péptidos sintéticos, se conjugaron covalentemente a la BSA mediante glutaraldehído. La BSA proporcionó una plataforma de mayor tamaño y múltiples sitios de unión, lo que favoreció tanto la inmovilización en la placa como la exposición de los epítomos a los anticuerpos presentes en los sueros de los inmunizados. La conjugación se estabilizó mediante reducción con NaBH_4 y se confirmó mediante SDS-PAGE. En comparación con la BSA no conjugada, los productos mostraron una migración heterogénea hacia regiones de mayor peso molecular, con bandas difusas (smear). Este patrón es característico con la formación de una mezcla de conjugados BSA-péptido con diferente grado de conjugación y entrecruzamiento. (Figura 11).

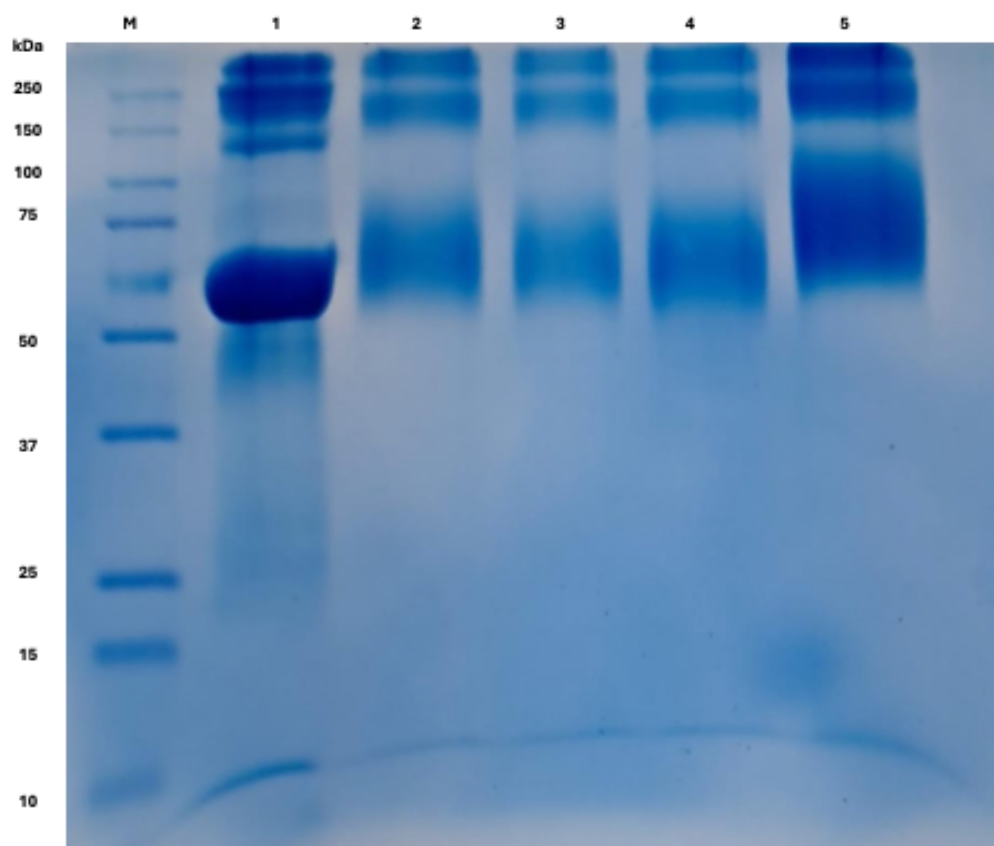


Figura 11. Conjugados de péptido sintéticos con BSA. Carriles: M, marcador de peso molecular en kDa; 1, proteína BSA antes de la conjugación; 2, smear del conjugado de péptido MP1 con BSA; 3, smear del conjugado de péptido MP2 con BSA; 4, smear del conjugado de péptido MP3 con BSA; y 5, smear del conjugado de BSA con BSA.

Se evaluó la respuesta inmune específica hacia los epítomos mediante los conjugados. Se utilizaron pools de suero provenientes del grupo de control y del grupo de dosis de 10 µg. No es posible realizar estadística inferencial clásica entre grupos. Por este motivo, se realizó un análisis descriptivo mediante curvas de titulación y la comparación del área bajo la curva (AUC) para evaluar las diferencias en la respuesta humoral entre los grupos. Se obtuvieron los siguientes resultados (Figura 12).

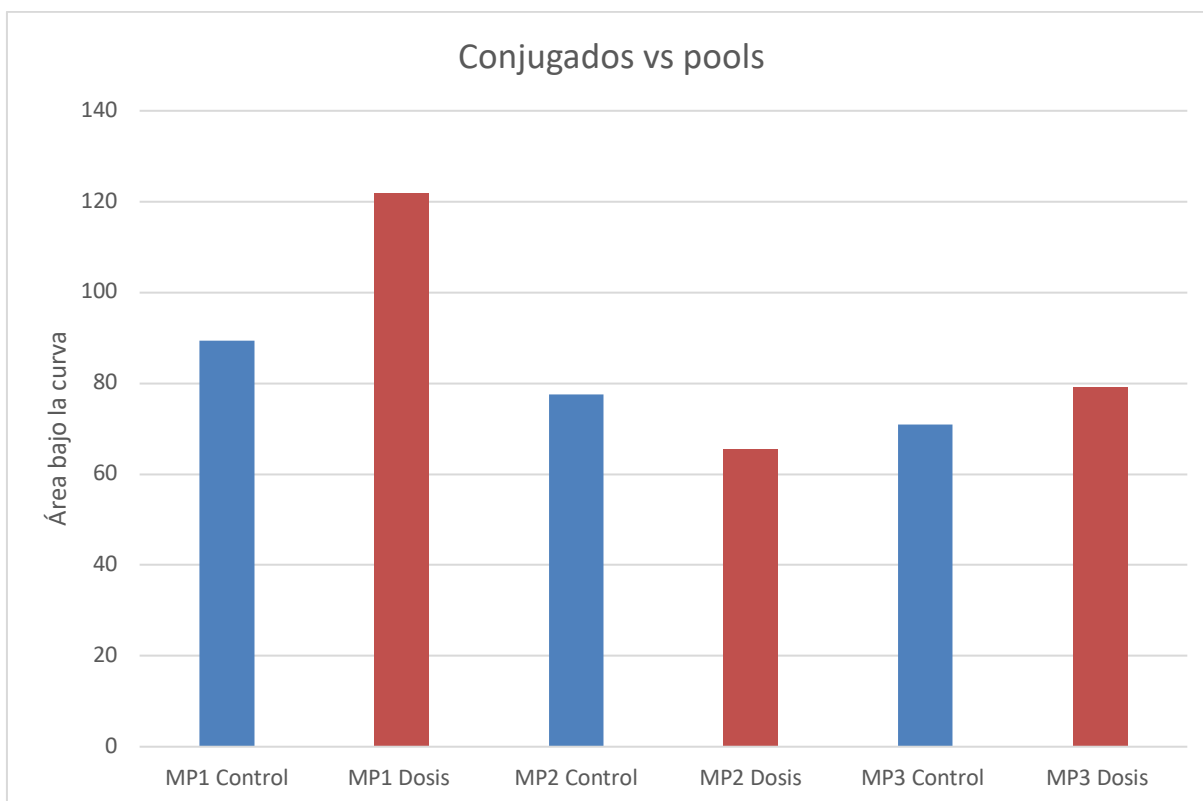


Figura 12. Respuesta sistémica de IgG inducida por LTB-MPX en ratones de prueba frente a conjugados de péptidos sintéticos con BSA. Se inmunizó a los ratones por vía subcutánea con LTB-MPX en un esquema de tres dosis y se tomaron muestras de suero tras la última dosis de refuerzo para realizar pruebas de ELISA con los conjugados de los péptidos MP1, MP2 y MP3 con BSA como antígenos diana.

El análisis de las curvas de titulación mostró diferencias en la reactividad de los anticuerpos entre los conjugados evaluados. El conjugado MP1 presentó una mayor señal en el pool del grupo de dosis en comparación con el control, y se mantuvo detectable en diluciones altas. Este comportamiento se reflejó en un AUC superior en el grupo de dosis. En contraste, el conjugado MP2 no mostró un incremento de la respuesta humoral en el grupo inmunizado. Por su parte, MP3 mostró un aumento moderado de la señal en el pool de dosis en comparación con el control.

8. Discusión

Los brotes de viruela símica, tanto dentro como fuera del continente africano, han

generado una gran preocupación en la comunidad científica. Se autorizó el uso de dos vacunas diferentes: ACAM2000, una vacuna de segunda generación basada en un virus vivo atenuado, y JYNNEOS, una vacuna de tercera generación que contiene un virus vivo no replicante, para adultos mayores de 18 años (excluyendo mujeres embarazadas o individuos inmunosuprimidos) con el fin de controlar estas emergencias de salud pública (Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades, 2026). Sin embargo, las vacunas que contienen virus vivos o atenuados plantean riesgos para la seguridad de las personas con sistemas inmunitarios comprometidos, así como para las mujeres embarazadas o lactantes (Olivieri et al., 2021). El brote de 2025, causado por el clado 1b, se caracterizó por un predominio de casos en la comunidad de hombres que tienen relaciones sexuales con hombres (Vivancos, 2022), una población de alto riesgo de contraer enfermedades de transmisión sexual. Además, varios estudios han demostrado que la protección que brindan las vacunas existentes es limitada (Zaeck et al., 2023; Hubert et al., 2023), lo que pone de relieve la necesidad urgente de desarrollar una vacuna específica contra el MPXV.

En este contexto, el presente estudio se centró en el diseño y la expresión de una proteína recombinante que comprende epítomos de las proteínas A30L y E8L fusionados al acarreador LTB de *E. coli*, como prototipo de una vacuna de subunidades multiepitópicas. Las vacunas multiepitópicas representan una estrategia precisa y segura para inducir inmunidad específica frente a múltiples regiones antigénicas de un patógeno. Al combinar epítomos conservados y altamente inmunogénicos, estas vacunas tienen el potencial de estimular tanto las respuestas humores como las celulares, mejorar la protección cruzada frente a diferentes variantes y minimizar las preocupaciones de seguridad asociadas a las vacunas tradicionales (Mortazavi, 2024). Hasta la fecha, no se han aprobado vacunas diseñadas como ensamblajes sintéticos de epítomos seleccionados, en gran parte porque diversos estudios y revisiones han destacado los desafíos normativos y de desarrollo que plantean. Sin embargo, algunas candidatas, como la UB612 para el SARS-CoV-2, han mostrado perfiles favorables de seguridad e inmunogenicidad en ensayos clínicos (Li et al., 2025; Wang et al., 2022). El uso de

E. coli como sistema de expresión mejora aún más la eficiencia de producción y la bioseguridad, ya que no requiere operar en instalaciones de alto nivel de bioseguridad (Li et al., 2025).

La caracterización bioinformática de LTB-MPX mostró resultados favorables en cuanto a la antigenicidad predicha, aunque también reveló posibles limitaciones en su estabilidad y solubilidad. La puntuación de 0,91 obtenida con VaxiJen superó el valor de corte de 0,40 establecido para antígenos virales, por lo que el constructo fue clasificado como potencialmente antigénico. VaxiJen realiza esta predicción a partir de las propiedades fisicoquímicas de la secuencia, sin recurrir a alineamientos (Doytchinova & Flower, 2007). Este resultado fue congruente con los ensayos experimentales, en los que LTB-MPX indujo anticuerpos específicos y permitió el reconocimiento de E8L. Sin embargo, esta predicción no demuestra por sí sola la inmunogenicidad ni la capacidad protectora.

A pesar de presentar un carácter predominantemente hidrofílico, determinado por un valor de GRAVY de $-0,32$, SCRATCH Protein Predictor estimó una probabilidad de 0,76 de acumulación en la fracción insoluble. Esta predicción coincidió con la recuperación experimental de LTB-MPX a partir de cuerpos de inclusión. Por tanto, su insolubilidad podría estar relacionada no solo con la hidropaticidad global, sino también con el plegamiento de la proteína quimérica, la distribución local de residuos hidrofóbicos y las condiciones de sobreexpresión en *E. coli* (Magnan et al., 2009).

Por otra parte, el índice de inestabilidad de 46,62 clasificó a LTB-MPX como potencialmente inestable in vitro, mientras que su índice alifático de 73,08 sugirió una estabilidad térmica moderada. Finalmente, AllergenFP v.1.0 clasificó el constructo como no alergénico, lo cual constituye una característica teórica favorable para su desarrollo (Dimitrov et al., 2014). En conjunto, los resultados respaldaron la viabilidad del diseño de LTB-MPX, aunque las predicciones de estabilidad, alergenicidad y solubilidad deben confirmarse experimentalmente.

La expresión de la proteína recombinante en *E. coli* Rosetta (DE3) se caracterizó principalmente por la formación de cuerpos de inclusión, un fenómeno común durante la expresión de proteínas heterólogas en sistemas bacterianos debido a la alta tasa de síntesis y a la capacidad limitada del mecanismo de plegamiento proteico (Singh et al., 2015; Rosano et al., 2014). Esta observación concuerda con informes previos que indican que la mayoría de las proteínas basadas en LTB descritas hasta ahora también se acumulan en forma de cuerpos de inclusión (Scerbo et al., 2008).

La localización de LTB-MPX en la fracción insoluble coincidió con la predicción obtenida con SCRATCH Protein Predictor, que estimó una probabilidad de insolubilidad de 0,76. Aunque el valor negativo del índice GRAVY indicó un carácter predominantemente hidrofílico, esta propiedad no garantiza que una proteína se exprese de forma soluble. La formación de cuerpos de inclusión también puede estar determinada por la velocidad de producción, la distribución local de residuos hidrofóbicos y las interacciones entre regiones parcialmente plegadas. En el caso de una proteína quimérica, la incorporación de múltiples epítomos y secuencias enlazadoras también puede modificar el plegamiento del dominio acarreador y favorecer la exposición de regiones con tendencia a la agregación.

Aunque la formación de cuerpos de inclusión requiere etapas posteriores de aislamiento, solubilización y renaturalización, también puede ser una ventaja para la recuperación de la proteína recombinante. Estos agregados suelen contener una proporción elevada de la proteína de interés, presentan cierta resistencia frente a la degradación proteolítica y pueden separarse con relativa facilidad del resto de los componentes celulares. Por ello, la acumulación insoluble de LTB-MPX no impidió su recuperación, sino que permitió concentrarla y establecer un procedimiento de lavado y solubilización que dio lugar a una fracción de alto grado de pureza antes de la renaturalización. No obstante, fue necesario aplicar un proceso controlado de eliminación del agente caotrópico para reducir la reagregación y favorecer la recuperación de una proteína estable.

La recuperación de la proteína LTB-MPX implicó etapas de solubilización y lavado secuenciales, seguidas de un proceso de diálisis para su renaturalización, lo que resultó en una proteína de alta pureza sin necesidad de purificación cromatográfica. Se obtuvo un rendimiento de 3,72 mg de proteína LTB-MPX renaturalizada por litro de cultivo. Se ha informado que el uso de *E. coli* Rosetta (DE3) como sistema de expresión produce entre 2,1 y 3 mg de proteína recombinante por litro de fermentación (Tegel et al., 2010), mientras que otros estudios centrados en proteínas quiméricas basadas en LTB han alcanzado rendimientos de hasta 3,5 mg/L (Solis-Andrade et al., 2022). Por lo tanto, el rendimiento obtenido tras la renaturalización de LTB-MPX se encuentra dentro del rango esperado para este sistema huésped.

Este enfoque representa una ventaja significativa en términos de eficiencia del proceso y de rentabilidad. Estudios recientes han demostrado que los cuerpos de inclusión pueden considerarse relativamente depósitos puros y concentrados de proteína, y que el uso de estrategias de solubilización con agentes caotrópicos, seguido de un replegamiento controlado puede preservar los elementos estructurales nativos y dar como resultado proteínas bioactivas sin recurrir a la cromatografía convencional (Singh et al., 2015; Klauser et al., 2023; Maksum et al., 2022). Del mismo modo, se ha informado de que la eliminación de los pasos cromatográficos es factible cuando las condiciones de replegamiento favorecen la preservación de la estructura secundaria y terciaria, manteniendo la funcionalidad y, en el caso de las proteínas antigénicas, la integridad de los epítomos conformacionales (Chura et al., 2022).

La evaluación de la inmunogenicidad tuvo como objetivo detectar la producción de anticuerpos frente a las secuencias A30L, E8L y LTB-MPX mediante ELISA. Se ha informado en diversos estudios que los epítomos presentes en la proteína LTB-MPX, así como en el portador LTB, son inmunogénicos (Swetha et al., 2022; Fantini et al., 2022). La respuesta positiva a la proteína E8L inducida por LTB-MPX concuerda con los hallazgos de Liu et al. (2025), quienes identificaron esta proteína como uno de los antígenos de superficie más inmunogénicos del MPXV. Los epítomos E8L

seleccionados también indujeron la producción de anticuerpos específicos, en consonancia con los descritos por Shantier et al. (2022). Por el contrario, la falta de una respuesta significativa contra la proteína A30L, a pesar de su inclusión en varios diseños de vacunas multiepitópicas (Kaur et al., 2024; Aziz et al., 2024; Lahimchi et al., 2023), sugiere que no todos los epítomos predichos necesariamente inducen respuestas de anticuerpos detectables en condiciones experimentales. Esta discrepancia puede deberse a factores como el plegamiento de la proteína, la accesibilidad de los epítomos o la eficiencia de la presentación del antígeno. Además, el uso de hidróxido de aluminio como adyuvante podría haber influido en la exposición y presentación de los epítomos de E8L de manera más efectiva que en los derivados de A30L. Tan et al. (2024) y Li et al. (2024) han reportado hallazgos similares, en los que las variaciones en la inmunogenicidad entre los antígenos recombinantes del MPXV se atribuyeron a diferencias en la conformación estructural y la interacción con los adyuvantes, a pesar de que las dosis de antígeno eran equivalentes. Los estudios futuros podrían centrarse en evaluar si el uso de diferentes enlaces o disposiciones de epítomos da lugar a una respuesta humoral diferencial.

La incorporación de A30L complementa el enfoque centrado en E8L al añadir un determinante de otra proteína asociada a la entrada viral. En términos de diseño, combinar epítomos de distintas dianas puede reducir la dependencia de una única interacción y permitir explorar respuestas mediadas por mecanismos potencialmente complementarios. Sin embargo, la antigenicidad de una proteína completa no garantiza que cualquier fragmento lineal conserve el reconocimiento observado en su conformación nativa. La posición del epítomo dentro de la quimera, la presencia de conectores y el plegamiento de las regiones adyacentes pueden influir en su exposición. Por ello, comparar experimentalmente la respuesta frente a E8L y A30L permite valorar no solo la elección de los antígenos, sino también la arquitectura particular de la construcción y orientar ajustes futuros en la secuencia o en el orden de los epítomos.

Se evaluó mediante ELISA la presencia de anticuerpos específicos de las subclases IgG1 e IgG2a. La detección de ambas subclases demuestra que la inmunización

promovió el cambio de isotipo y generó una respuesta humoral específica. En ratones BALB/c, la producción de IgG1 se relaciona principalmente con señales mediadas por IL-4 y se utiliza como indicador indirecto de respuestas Th2, mientras que el cambio de isotipo hacia IgG2a se asocia con la acción del IFN- γ y con ambientes inmunológicos de tipo Th1 (Peng et al., 2002). Por lo tanto, la presencia simultánea de IgG1 e IgG2a sugiere que LTB-MPX indujo componentes humorales asociados a ambos perfiles inmunológicos.

Sin embargo, la señal correspondiente a IgG1 fue mayor que la detectada para IgG2a. A partir de las absorbancias corregidas respecto al control negativo, se obtuvo una relación IgG2a/IgG1 de 0,12. Dado que este valor fue menor que 1, los resultados sugieren un predominio del componente asociado a Th2.

Este comportamiento es congruente porque la formulación incluyó hidróxido de aluminio, un adyuvante que generalmente favorece respuestas de tipo Th2 y la producción predominante de IgG1. En modelos murinos, las formulaciones con aluminio suelen generar principalmente IgG1 y una respuesta celular limitada, mientras que los estímulos Th1 producen mayores cantidades de IgG2a (Davis et al., 1998). En este contexto, la detección de IgG2a en los grupos inmunizados podría indicar que algún componente de LTB-MPX contribuyó a ampliar el perfil inmunológico inducido por el adyuvante. La presencia de LTB como proteína acarreadora podría contribuir a esta respuesta. Se ha reportado que LTB incrementa la inmunogenicidad de antígenos fusionados y puede favorecer respuestas humorales mixtas. Por ejemplo, da Cunha et al. (2017) observaron producción de IgG1 e IgG2a en ratones BALB/c inmunizados con una proteína de fusión basada en LTB, incluso en presencia de hidróxido de aluminio, lo cual se interpretó como una respuesta mixta Th1/Th2. De manera similar, Kaushik et al. (2019) reportaron incrementos significativos de IgG1, IgG2a e IgG2b tras inmunizar ratones con un epítipo fusionado a LTB, lo que respalda la capacidad de este acarreador para inducir más de una subclase de anticuerpos. No obstante, dado que en el presente estudio no se incluyó un grupo inmunizado con el antígeno sin LTB, no es posible atribuir directamente la producción de IgG2a a esta proteína acarreadora.

En conjunto, los resultados indican que LTB-MPX, formulada con hidróxido de aluminio, indujo una respuesta humoral predominantemente asociada a Th2, pero acompañada de un componente relacionado con Th1, evidenciado por la producción de IgG2a. Sin embargo, esta interpretación debe considerarse una aproximación indirecta y no una demostración de la polarización funcional de los linfocitos T. Las diferencias en afinidad y eficiencia de detección entre los anticuerpos secundarios anti-IgG1 y anti-IgG2a pueden influir en la magnitud de las señales detectadas. Para confirmar el perfil inmunológico sería necesario complementar estos resultados mediante la cuantificación de citocinas como IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-5, así como mediante técnicas como ELISpot, citometría de flujo intracelular o análisis de proliferación de linfocitos T.

Se realizó un ELISA con péptidos libres basados en los epítomos de las proteínas diana A30L y E8L, con el fin de determinar si el esquema inmunológico con LTB-MPX fue capaz de generar anticuerpos específicos contra dichos péptidos. La ausencia de una respuesta significativa en el ELISA realizado con los péptidos libres no necesariamente indica que la inmunización con LTB-MPX fuera incapaz de inducir anticuerpos contra dichas secuencias. Los péptidos sintéticos utilizados son moléculas de bajo peso molecular que pueden adsorberse de manera poco eficiente o inestable sobre las placas de poliestireno. En consecuencia, parte del péptido puede eliminarse durante los lavados o quedar inmovilizada en una orientación que oculte los residuos necesarios para la unión de los anticuerpos. Se ha demostrado que la adsorción directa de péptidos pequeños sobre el poliestireno puede resultar insuficiente para alcanzar una sensibilidad adecuada mediante ELISA (Cuccuru et al., 2012).

Además de las limitaciones de inmovilización, la falta de reconocimiento puede relacionarse con diferencias estructurales entre los péptidos libres y los epítomos incluidos en LTB-MPX. Aunque las secuencias evaluadas corresponden a epítomos lineales, su presentación en la proteína quimérica está influida por los aminoácidos adyacentes, los linkers y la conformación del constructo. En cambio, cuando los péptidos se encuentran libres, pueden adoptar conformaciones distintas o presentar una elevada flexibilidad, lo que reduce su afinidad por los anticuerpos. La capacidad de un anticuerpo para reconocer una secuencia peptídica depende no solo de su

estructura primaria, sino también de la conformación y la accesibilidad que adopta dicha secuencia durante el ensayo (Loomans et al., 1997). Por lo tanto, los resultados negativos obtenidos inicialmente podrían atribuirse tanto a una presentación inadecuada de los péptidos como a una concentración insuficiente del epítipo disponible en la superficie de la placa.

Para favorecer su inmovilización y exposición, los péptidos MP1, MP2 y MP3 se conjugaron con BSA mediante glutaraldehído. La BSA presenta un mayor tamaño y una elevada capacidad de adsorción sobre el poliestireno, por lo que actúa como una proteína de soporte que permite presentar múltiples copias del péptido en la superficie del pozo. Esta presentación multivalente puede aumentar la densidad del epítipo y facilitar la interacción con los anticuerpos presentes en los sueros. La conjugación con proteínas acarreadoras, como la BSA, constituye una estrategia para mejorar la inmovilización y el reconocimiento de péptidos pequeños en ensayos inmunoenzimáticos (Cuccuru et al., 2012). Incluso en estudios serológicos contra el MPXV, la conjugación de péptidos con BSA se ha evaluado como una estrategia para mejorar el rendimiento de los ELISA basados en epítipos sintéticos (Dubois et al., 2012).

El glutaraldehído permitió establecer enlaces covalentes entre los grupos amino disponibles de los péptidos y de la BSA, lo que dio lugar a complejos de mayor peso molecular. La formación de estos conjugados fue respaldada por el patrón de migración observado en SDS-PAGE, caracterizado por un *smear* por encima de la banda correspondiente a la BSA no conjugada. Este comportamiento es consistente con la formación de una población heterogénea de conjugados, en la que las moléculas de BSA pueden contener diferentes cantidades de péptido.

Tras mejorar la presentación mediante la conjugación, MP1 mostró la mayor reactividad frente a los sueros de animales inmunizados con LTB-MPX. Dado que MP1 contiene un epítipo derivado de E8L, este resultado concuerda con el reconocimiento significativo previamente observado al emplear la proteína E8L recombinante como antígeno de recubrimiento. En conjunto, ambos ensayos respaldan la inmunización con antígenos dirigidos contra al menos una región antigénica de E8L y sugieren que el epítipo presente en MP1 fue más accesible o

inmunodominante que las secuencias evaluadas en MP2 y MP3.

Sin embargo, la diferencia entre los conjugados debe interpretarse con cautela, ya que la conjugación con glutaraldehído es heterogénea y no permite asegurar que todos los péptidos se hayan unido a la BSA con la misma eficiencia, densidad ni orientación. Por ello, una mayor absorbancia o una mayor área bajo la curva de MP1 puede reflejar tanto una mayor concentración de anticuerpos específicos como una presentación más favorable de este péptido en el conjugado. La inclusión de BSA tratada bajo las mismas condiciones que el control permite descartar que la señal provenga exclusivamente del acarreador o de modificaciones ocurridas durante la conjugación.

La detección de IgG específica contra LTB-MPX, tres meses después de la tercera inmunización, demuestra que la respuesta humoral inducida por el antígeno persistió más allá de la fase inmediata posterior al esquema de vacunación. Después de la exposición al antígeno, los plasmablastos producen anticuerpos en las etapas iniciales de la respuesta; posteriormente, la mayoría de ellos desaparece durante la fase de contracción, mientras que una fracción de los linfocitos B puede diferenciarse en células plasmáticas de larga vida. Estas células pueden alojarse en nichos especializados, principalmente en la médula ósea, y mantener la secreción de anticuerpos durante periodos prolongados, incluso sin una nueva exposición al antígeno (Khodadadi et al., 2019).

Además de las células plasmáticas de larga vida, la inmunización puede generar linfocitos B de memoria, que permanecen en estado de quiescencia y responden rápidamente ante una nueva exposición al antígeno. Sin embargo, los anticuerpos circulantes y las células B de memoria son componentes distintos de la memoria inmunológica. Se ha demostrado que las células plasmáticas pueden sobrevivir y mantener anticuerpos específicos durante periodos prolongados, incluso en ausencia de células B de memoria (Hammarlund et al., 2017). Por ello, la persistencia de IgG contra LTB-MPX es compatible con el establecimiento de una respuesta humoral duradera, pero no demuestra directamente la generación de células B de memoria.

La persistencia observada también puede relacionarse con el esquema de tres

inmunizaciones utilizado. Las dosis de refuerzo favorecen la reactivación y expansión de linfocitos B específicos, así como los procesos de maduración de afinidad y diferenciación celular. De esta forma, el esquema de inmunización pudo contribuir al mantenimiento de anticuerpos específicos durante el periodo evaluado. No obstante, la duración de la respuesta humoral también depende de las propiedades del antígeno, del adyuvante, de la vía de administración y de la intensidad de la estimulación inicial. En este sentido, se ha demostrado que la persistencia de los anticuerpos varía entre distintos antígenos virales y vacunales, lo que indica que las características de cada antígeno influyen en la longevidad de la respuesta (Amanna et al., 2007).

En conjunto, la conservación de niveles significativos de IgG durante tres meses constituye un resultado favorable para LTB-MPX como candidato vacunal, ya que demuestra que la respuesta humoral no se limitó al periodo inmediatamente posterior a la última inmunización. Sin embargo, la presencia de anticuerpos específicos no confirma que estos posean actividad neutralizante ni que proporcionen protección frente a una infección. Para demostrar el establecimiento de memoria humoral funcional sería necesario evaluar directamente células B de memoria o células plasmáticas de larga vida, analizar la respuesta frente a una dosis de refuerzo y determinar la capacidad neutralizante de los anticuerpos.

Entre las principales limitaciones del estudio se encuentran el reducido número de animales por grupo, la ausencia de marcadores celulares, el uso de pools de suero para evaluar los conjugados, la falta de caracterización cuantitativa de la eficiencia de conjugación y la ausencia de ensayos de neutralización o de desafío viral. Por ello, los resultados demuestran inmunogenicidad y reconocimiento antigénico, pero no permiten establecer la eficacia protectora.

9. Conclusiones

La caracterización bioinformática de LTB-MPX indicó que el constructo presenta propiedades compatibles con su evaluación como antígeno recombinante. La proteína presentó una antigenicidad predicha elevada y un bajo potencial alérgico; asimismo, se predijo su acumulación preferente en la fracción insoluble,

lo cual coincidió con su comportamiento experimental en *E. coli*.

La proteína quimérica LTB-MPX se expresó con éxito en *E. coli* Rosetta (DE3), principalmente en forma de cuerpos de inclusión. Su recuperación mediante lavados secuenciales, solubilización con urea y renaturalización por diálisis permitió obtener una preparación con una concentración de 287,59 µg/mL, una pureza superior al 90% determinada por densitometría y un rendimiento, calculado después de la renaturalización, de 3,72 mg por litro de cultivo, sin requerir etapas cromatográficas. Estos resultados demuestran la viabilidad de producir y recuperar el antígeno mediante un proceso relativamente sencillo.

La inmunización subcutánea con LTB-MPX indujo una respuesta sistémica de IgG específica contra la proteína quimérica en ratones BALB/c. No se identificaron diferencias significativas entre las dosis de 5 y 10 µg tras la tercera inmunización, por lo que, bajo las condiciones evaluadas, ambas dosis fueron capaces de inducir reconocimiento humoral del antígeno.

Los anticuerpos generados reconocieron de manera significativa la proteína E8L, mientras que no se detectó una respuesta significativa frente a A30L. Este resultado demuestra que la inclusión de un epítipo en una construcción multiepitópica no garantiza, por sí misma, su reconocimiento y que la posición, la accesibilidad, la conformación y el contexto estructural de cada secuencia pueden determinar su inmunogenicidad.

La relación IgG2a/IgG1 de 0,12 sugiere que la inmunización con LTB-MPX indujo una respuesta humoral predominantemente asociada a Th2, lo cual es congruente con el empleo de hidróxido de aluminio. No obstante, la detección de IgG2a evidencia la presencia adicional de un componente asociado a Th1. Esta interpretación representa una aproximación indirecta que deberá confirmarse mediante la evaluación de citocinas y respuestas celulares.

Los péptidos sintéticos libres no mostraron un reconocimiento significativo,

posiblemente debido a su limitada inmovilización limitada en la placa y a una exposición insuficiente de las secuencias antigénicas. La conjugación con BSA mejoró su rendimiento en el ELISA y permitió identificar una mayor reactividad frente a MP1. Debido a que este péptido contiene una secuencia derivada de E8L, el resultado concuerda con el reconocimiento observado frente a la proteína E8L recombinante y respalda que LTB-MPX indujo anticuerpos dirigidos contra al menos uno de los epítomos incluidos en su diseño. No obstante, las diferencias entre conjugados también pudieron deberse a variaciones en la eficiencia, la densidad o la orientación de la conjugación.

La respuesta de IgG específica contra LTB-MPX permaneció detectable durante tres meses después de la última inmunización, lo que demuestra la persistencia de la respuesta humoral durante el periodo evaluado. Este resultado no constituye, por sí solo, evidencia directa de células B de memoria ni de actividad protectora, por lo que serán necesarios ensayos funcionales y celulares para confirmarlas.

En conjunto, los resultados posicionan a LTB-MPX como una plataforma experimental útil para evaluar la inmunogenicidad de epítomos derivados de MPXV. El reconocimiento diferencial de E8L y A30L demuestra la importancia de validar experimentalmente los diseños inmunoinformáticos y proporciona una base para optimizar el orden, el número y la exposición de los epítomos. Aunque todavía no puede considerarse una vacuna protectora, el constructo constituye un prototipo prometedor para continuar los estudios de neutralización, memoria inmunológica, respuesta celular y protección frente a MPXV.

10. Referencias

- Ahmad, S., Aslam, S., & Khalid, A. (2026). Multi-epitope vaccine design against Monkeypox virus: An immunoinformatics approach. *PloS one*, 21(2), e0342087. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0342087>
- Ahuja, R., Vishwakarma, P., Kumar, V., Khatri, R., Chatterjee, A., Mishra, S.,

- Rizvi, Z. A., Singh, A., Kaur, G., Maithil, V., Tarane, K., Chauhan, A., Singh, S., Yadav, P., Yadav, D., Sinha, S. K., Ali, S. K., Chatterjee, A., Priyadarsiny, P., . . . Samal, S. (2025). Next-gen novel nanocage-based multivalent vaccine candidate to tackle the rising menace of Mpox. *Npj Vaccines*, 10(1), 117. <https://doi.org/10.1038/s41541-025-01174-1>
- Aktaş, E., Sezerman, O. U., Özer, M., Kırboğa, K. K., Köseoğlu, A. E., & Özgentürk, N. Ö. (2025). Identification of potential antigenic proteins and epitopes for the development of a monkeypox virus vaccine: an in silico approach. *Molecular diversity*, 29(5), 4273–4291. <https://doi.org/10.1007/s11030-024-11033-1>
- Alakunle, E., Moens, U., Nchinda, G., & Okeke, M. I. (2020). Monkeypox virus in Nigeria: Infection biology, epidemiology, and evolution. *Viruses*, 12(11), 1257. <https://doi.org/10.3390/v12111257>
- Ali, T., Mujawar, S., Sowmya, A. V., Saldanha, D., & Chaudhury, S. (2021). Dangers of mRNA vaccines. *Industrial Psychiatry Journal*, 30(Suppl. 1), S291–S293. <https://doi.org/10.4103/0972-6748.328833>
- Altindis, M., Puca, E., & Shapo, L. (2022). Diagnosis of monkeypox virus—An overview. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 50, 102459. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2022.102459>
- Amanna, I. J., Carlson, N. E., & Slifka, M. K. (2007). Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. *The New England Journal of Medicine*, 357(19), 1903–1915. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa066092>
- Attique, L., Jamal, S. B., Gulistan, T., Haider, A., Amraiz, D., Abbasi, S. W., Ahmad, S., & Aljasir, M. A. (2026). Multiepitope-based peptide vaccine against A35R glycoprotein and E8L membrane protein of monkeypox virus using an immunoinformatics approach. *Biology*, 15(7), 524. <https://doi.org/10.3390/biology15070524>
- Aziz, S., Liò, P., Khan, Y., Ali, A., Iqbal, A., Khan, M., & Almajhdi, F. (2023). Immunoinformatics design of multivalent epitope vaccine against monkeypox virus and its variants using membrane-bound, enveloped, and extracellular proteins as targets. *Frontiers in Immunology*, 14, 1091941. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1091941>

- Beer, E. M., & Rao, V. B. (2019). A systematic review of the epidemiology of human monkeypox outbreaks and implications for outbreak strategy. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(10), e0007791. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007791>
- Bunge, E. M., Hoet, B., Chen, L., Lienert, F., Weidenthaler, H., Baer, L. R., & Steffen, R. (2022). The changing epidemiology of human monkeypox—A potential threat? A systematic review. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 16(2), e0010141. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010141>
- Candela, C., Raccagni, A. R., Bruzzesi, E., Bertoni, C., Rizzo, A., Gagliardi, G., Canetti, D., Gianotti, N., Mileto, D., Gismondo, M. R., Castagna, A., Nozza, S., & Centro San Luigi (CSL) Working Group. (2023). Human monkeypox experience in a tertiary level hospital in Milan, Italy, between May and October 2022: Epidemiological features and clinical characteristics. *Viruses*, 15(3), 667. <https://doi.org/10.3390/v15030667>
- Carrero, Y., & Contreras, M. (2022). Brote de la viruela del mono de 1970 al 2022: ¿Un nuevo peligro? *Kasmera*, 50, e5038190. <https://doi.org/10.56903/kasmera.5038190>
- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. (2025, 9 de mayo). *Acerca de la viruela símica (monkeypox)*. <https://www.cdc.gov/monkeypox/es/about/index.html>
- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. (2026, 19 de agosto). Descripción general clínica de los clados I y II de la viruela del mono. <https://www.cdc.gov/monkeypox/hcp/clinical-overview/index.html>
- Chadha, J. , Khullar, L. , Gulati, P. , Chhibber, S. y Harjai, K. (2022) Perspectivas sobre el virus de la viruela del mono: ¿La creación de otra pandemia dentro de la pandemia? *Microbiología ambiental* , 24(10), 4547–4560. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16174>
- Chura-Chambi, R. M., Farah, C. S., & Morganti, L. (2022). Human growth hormone inclusion bodies present native-like secondary and tertiary structures which can be preserved by mild solubilization for refolding. *Microbial Cell Factories*, 21, 164. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01887-1>
- Cohn, H., Bloom, N., Cai, G. Y., Clark, J. J., Tarke, A., Bermúdez-González, M.

- C., Altman, D. R., Lugo, L. A., Lobo, F. P., Marquez, S., PVI study group, Chen, J. Q., Ren, W., Qin, L., Yates, J. L., Hunt, D. T., Lee, W. T., Crotty, S., Krammer, F., Grifoni, A., ... Coelho, C. H. (2023). Mpox vaccine and infection-driven human immune signatures: an immunological analysis of an observational study. *The Lancet. Infectious diseases*, 23(11), 1302–1312. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00352-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00352-3)
- Cuccuru, M. A., Dessì, D., Rappelli, P., & Fiori, P. L. (2012). A simple, rapid and inexpensive technique to bind small peptides to polystyrene surfaces for immunoenzymatic assays. *Journal of Immunological Methods*, 382(1–2), 216–219. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.05.023>
- da Cunha, C. E. P., Moreira, C., Jr., Rocha, A. da S. R., Finger, P. F., Magalhães, C. G., Ferreira, M. R. A., Dellagostin, O. A., Moreira, Â. N., & Conceição, F. R. (2017). Parenteral adjuvant potential of recombinant B subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 112(12), 812–816. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170133>
- Davis, H. L., Weeratna, R., Waldschmidt, T. J., Tygrett, L., Schorr, J., & Krieg, A. M. (1998). CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *The Journal of Immunology*, 160(2), 870–876.
- De la Calle-Prieto, F., Estébanez Muñoz, M., Ramírez, G., Díaz-Menéndez, M., Velasco, M., Azkune Galparsoro, H., Salavert Lletí, M., Mata Forte, T., Blanco, J. L., Mora-Rillo, M., Arsuaga, M., De Miguel Buckley, R., Arribas, J. R., & Membrillo, F. J. (2023). Tratamiento y prevención de la viruela del mono. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 41(10), 629–634. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2022.08.001>
- Deputy, N. P., Deckert, J., Chard, A. N., Sandberg, N., Moulia, D. L., Barkley, E., Dalton, A. F., Sweet, C., Cohn, A. C., Little, D. R., Cohen, A. L., Sandmann, D., Payne, D. C., Gerhart, J. L., & Feldstein, L. R. (2023). Vaccine effectiveness of JYNNEOS against mpox disease in the United States. *The New England Journal of Medicine*, 388(26), 2434–2443. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2215201>
- Dimitrov, I., Naneva, L., Doytchinova, I., & Bangov, I. (2014). AllergenFP: Allergenicity prediction by descriptor fingerprints. *Bioinformatics*, 30(6), 846–

851. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt619>

Doytchinova, I. A., & Flower, D. R. (2007). VaxiJen: A server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics*, 8, 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-4>

Dubois, M. E., Hammarlund, E., & Slifka, M. K. (2012). Optimization of peptide-based ELISA for serological diagnostics: A retrospective study of human monkeypox infection. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(5), 400–409. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0779>

Fantini, J., Chahinian, H., & Yah, N. (2022). A vaccine strategy based on the identification of an annular ganglioside binding motif in monkeypox virus protein E8L. *Viruses*, 14(11), 2531. <https://doi.org/10.3390/v14112531>

Frey, A. W., Atyeo, C., Earl, P. L., Americo, J. L., Chuang, G.-Y., Natarajan, H., Frey, T. R., Gall, J. G., Moliva, J. I., Hunegnaw, R., Asthagiri Arunkumar, G., Ogega, C. O., Nasir, A., Santos, G., Levin, R. H., Meni, A., Jorquera, P. A., Bennett, H., Johnson, J. A., ... Moss, B. (2023). An mpox virus mRNA-lipid nanoparticle vaccine confers protection against lethal orthopoxviral challenge. *Science Translational Medicine*, 15(716), eadg3540. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.adg3540>

Gaspari, V., Rossini, G., Robuffo, S., Rapparini, L., Scagliarini, A., Mistral De Pascali, A., Piraccini, B. M., & Lazzarotto, T. (2023). Monkeypox outbreak 2022: Clinical and virological features of 30 patients at the Sexually Transmitted Diseases Centre of Sant'Orsola Hospital, Bologna, Northeastern Italy. *Journal of Clinical Microbiology*, 61(1), e01365-22. <https://doi.org/10.1128/jcm.01365-22>

Gong, Q., Wang, C., Chuai, X., & Chiu, S. (2022). Monkeypox virus: A re-emergent threat to humans. *Virologica Sinica*, 37(4), 477–482. <https://doi.org/10.1016/j.virs.2022.07.006>

Gruber, M. F. (2022). Current status of monkeypox vaccines. *npj Vaccines*, 7(1), 94. <https://doi.org/10.1038/s41541-022-00527-4>

Hammarlund, E., Thomas, A., Amanna, I. J., Holden, L. A., Slayden, O. D., Park, B., Gao, L., & Slifka, M. K. (2017). Plasma cell survival in the absence of B cell memory. *Nature Communications*, 8(1), 1781. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01901-w>

- Hansson, M., Nygren, P.-Å., & Ståhl, S. (2000). Design and production of recombinant subunit vaccines. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 32(2), 95–107. <https://doi.org/10.1042/BA20000034>
- Hubert, M., Guivel-Benhassine, F., Bruel, T., Porrot, F., Planas, D., Vanhomwegen, J., Wiedemann, A., Burrel, S., Marot, S., Palich, R., Monsel, G., Diombera, H., Gallien, S., Lopez-Zaragoza, J. L., Vindrios, W., Taieb, F., Fernandes-Pellerin, S., Delhaye, M., Laude, H., ... Schwartz, O. (2023). Complement-dependent mpox-virus-neutralizing antibodies in infected and vaccinated individuals. *Cell Host & Microbe*, 31(6), 937–948.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.05.001>
- Jegerlehner, A., Wiesel, M., Dietmeier, K., Zabel, F., Gatto, D., Saudan, P., & Bachmann, M. F. (2010). Carrier induced epitopic suppression of antibody responses induced by virus-like particles is a dynamic phenomenon caused by carrier-specific antibodies. *Vaccine*, 28(33), 5503–5512. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.02.103>
- Jessie, B., & Dobrovolny, H. M. (2021). The role of syncytia during viral infections. *Journal of Theoretical Biology*, 525, 110749. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2021.110749>
- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451(7181), 990–993. <https://doi.org/10.1038/nature06536>
- Kandeel, M., Morsy, M. A., Abd El-Lateef, H. M., Marzok, M., El-Beltagi, H. S., Al Khodair, K. M., Albokhadaim, I., & Venugopala, K. N. (2023). Efficacy of the modified vaccinia Ankara virus vaccine and the replication-competent vaccine ACAM2000 in monkeypox prevention. *International Immunopharmacology*, 119, 110206. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.110206>
- Kaur, A., Kumar, A., Kumari, G., Muduli, R., Das, M., Kundu, R., Mukherjee, S., & Majumdar, T. (2024). Rational design and computational evaluation of a multi-epitope vaccine for monkeypox virus: Insights into binding stability and immunological memory. *Heliyon*, 10(16), e36154. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e36154>
- Kaushik, H., Deshmukh, S. K., Solanki, A. K., Bhatia, B., Tiwari, A., & Garg, L.

- C. (2019). Immunization with recombinant fusion of LTB and linear epitope (40–62) of epsilon toxin elicits protective immune response against the epsilon toxin of *Clostridium perfringens* type D. *AMB Express*, 9(1), 105. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0824-3>
- Khan, S., Rizwan, M., Zeb, A., Eldeen, M. A., Hassan, S., Ur Rehman, A., Eid, R. A., Zaki, M. S. A., Albadrani, G. M., Altyar, A. E., Nouh, N. A. T., Abdel-Daim, M. M., & Ullah, A. (2023). Identification of a potential vaccine against *Treponema pallidum* using subtractive proteomics and reverse-vaccinology approaches. *Vaccines*, 11(1), 72. <https://doi.org/10.3390/vaccines11010072>
- Khodadadi, L., Cheng, Q., Radbruch, A., & Hiepe, F. (2019). The maintenance of memory plasma cells. *Frontiers in Immunology*, 10, 721. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00721>
- Kim, B.-M., & Kang, T.-J. (2019). Expression of B subunit of *E. coli* heat-labile enterotoxin in the progenies of transgenic tobacco bred by crossing nuclear- and chloroplast-transgenic lines. *Protein Expression and Purification*, 155, 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.11.005>
- Klausser, R., Kopp, J., Prada Brichtova, E., Gisberg, F., Elshazly, M., & Spadiut, O. (2023). State-of-the-art and novel approaches to mild solubilization of inclusion bodies. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1249196. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1249196>
- Kumar, N., Acharya, A., Gendelman, H. E., & Byraredy, S. N. (2022). The 2022 outbreak and the pathobiology of the monkeypox virus. *Journal of Autoimmunity*, 131, 102855. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2022.102855>
- Lahimchi, M. R., Madanchi, H., Ahmadi, K., Shahbazi, B., & Yousefi, B. (2024). In silico designing a novel TLR4-mediating multiepitope vaccine against monkeypox via advanced immunoinformatics and bioinformatics approaches. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 42(4), 2094–2110. <https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2203253>
- Law, M., & Smith, G. L. (2001). Antibody neutralization of the extracellular enveloped form of vaccinia virus. *Virology*, 280(1), 132–142. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0750>
- Li, J., Ju, Y., Jiang, M., Li, S., & Yang, X. Y. (2025). Epitope-based vaccines: The

next generation of promising vaccines against bacterial infection. *Vaccines*, 13(3), 248. <https://doi.org/10.3390/vaccines13030248>

Li, J., Li, X., Dong, J., Wei, J., Guo, X., Wang, G., Xu, M., & Zhao, A. (2024). Enhanced immune responses in mice by combining the mpox virus B6R-protein and aluminum hydroxide-CpG vaccine adjuvants. *Vaccines*, 12(7), 776. <https://doi.org/10.3390/vaccines12070776>

Liljeqvist, S., & Ståhl, S. (1999). Production of recombinant subunit vaccines: Protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *Journal of Biotechnology*, 73(1), 1–33. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00107-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00107-8)

Liu, J., Wang, X., Zhang, Y., Liu, C., Zhang, M., Li, C., Liu, P., Li, S., Wei, K., Cai, Y., Yu, H., Hu, Z., Wang, P., & Zhang, Y. (2025). Immunogenicity of monkeypox virus surface proteins and cross-reactive antibody responses in vaccinated and infected individuals: Implications for vaccine and therapeutic development. *Infectious Diseases of Poverty*, 14, 12. <https://doi.org/10.1186/s40249-025-01280-1>

Loomans, E. E. M. G., Beumer, T. A. M., Dame, K. C. S., Bakker, M. A., & Schielen, W. J. G. (1997). Real-time monitoring of peptide-surface and peptide-antibody interaction by means of reflectometry and surface plasmon resonance. *Journal of Colloid and Interface Science*, 192(1), 238–247. <https://doi.org/10.1006/jcis.1997.5008>

Lu, J., Xing, H., Wang, C., Tang, M., Wu, C., Ye, F., Yin, L., Yang, Y., Tan, W., & Shen, L. (2023). Mpox (formerly monkeypox): Pathogenesis, prevention, and treatment. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 458. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01675-2>

Magnan, C. N., Randall, A., & Baldi, P. (2009). SOLpro: Accurate sequence-based prediction of protein solubility. *Bioinformatics*, 25(17), 2200–2207. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp386>

Maksum, I. P., Yosua, Y., Nabel, A., Pratiwi, R. D., Sriwidodo, S., & Soedjanaatmadja, U. M. S. (2022). Refolding of bioactive human epidermal growth factor from *E. coli* BL21(DE3) inclusion bodies and evaluations on its *in vitro* and *in vivo* bioactivity. *Heliyon*, 8(4), e09306. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09306>

Maleki, A., Russo, G., Parasiliti Palumbo, G. A., & Pappalardo, F. (2022). In silico design of recombinant multi-epitope vaccine against influenza A virus. *BMC Bioinformatics*, 22(Suppl. 14), 617. <https://doi.org/10.1186/s12859-022-04581-6>

Meng, E. C., Goddard, T. D., Pettersen, E. F., Couch, G. S., Pearson, Z. J., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2023). UCSF ChimeraX: Tools for structure building and analysis. *Protein Science*, 32(11), e4792. <https://doi.org/10.1002/pro.4792>

Mortazavi, B., Molaei, A., & Allahyari Fard, N. (2024). Multi-epitope vaccines, from design to expression: An *in silico* approach. *Human Immunology*, 85(3), 110804. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2024.110804>

MotherToBaby. (2024, octubre). *Vacuna contra la viruela ACAM2000®*. NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK583260/>

Nuzzo, J. B., Borio, L. L., & Gostin, L. O. (2022). The WHO declaration of monkeypox as a global public health emergency. *JAMA*, 328(7), 615–617. <https://doi.org/10.1001/jama.2022.12513>

Octavio-Aguilar, P., & González-Granillo, O. A. (2023). Pandemias virales: Aspectos generales sobre tres zoonosis de importancia médica. *Herreriana*, 5(1), 37–42. <https://doi.org/10.29057/h.v5i1.8564>

Olivieri, B., Betterle, C., & Zanoni, G. (2021). Vaccinations and autoimmune diseases. *Vaccines*, 9(8), 815. <https://doi.org/10.3390/vaccines9080815>

Organización Panamericana de la Salud. (s. f.). *Mpox (viruela símica)*. Recuperado el 15 de septiembre de 2026, de <https://www.paho.org/es/mpoxenfermedad>

Peng, S. L., Szabo, S. J., & Glimcher, L. H. (2002). T-bet regulates IgG class switching and pathogenic autoantibody production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(8), 5545–5550. <https://doi.org/10.1073/pnas.082114899>

Ramprasad, S. V., Rajakumar, S., Srinivasan, S., Susha, D., Sharma, S., & Chourasiya, R. (2023). Computer-aided multi-epitope based vaccine design against monkeypox virus surface protein A30L: An immunoinformatics approach. *The Protein Journal*, 42(6), 645–663. <https://doi.org/10.1007/s10930-023-10150-4>

Rcheulishvili, N., Mao, J., Papukashvili, D., Feng, S., Liu, C., Wang, X., He, Y.,

- & Wang, P. G. (2023). Design, evaluation, and immune simulation of potentially universal multi-epitope mpox vaccine candidate: Focus on DNA vaccine. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1203355. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1203355>
- Reed, K. D. (2018). Viral zoonoses. In *Reference module in biomedical sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.95729-5>
- Rezaee, M. A., Rezaee, A., Moazzeni, S. M., Salmanian, A. H., Yasuda, Y., Tochikubo, K., Pirayeh, S. N., & Arzanlou, M. (2005). Expression of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit (LTB) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Microbiology*, 43(4), 354–360.
- Rizk, J. G., Lippi, G., Henry, B. M., Forthal, D. N., & Rizk, Y. (2022). Prevention and treatment of monkeypox. *Drugs*, 82(9), 957–963. <https://doi.org/10.1007/s40265-022-01742-y>
- Riswana, F. R., & Punjungsari, T. N. (2025). Analysis of B-cell epitope on E8L protein monkeypox virus as a peptide-based vaccine candidate. *BIO Web of Conferences*, 198, 07001. <https://doi.org/10.1051/bioconf/202519807001>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, 172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Scerbo, M. J., Bibolini, M. J., Barra, J. L., Roth, G. A., & Monferran, C. G. (2008). Expression of bioactive fusion protein of *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit and a synapsin peptide. *Protein Expression and Purification*, 59(2), 320–326. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.02.017>
- Schmidt, F. I., Bleck, C. K., Helenius, A., & Mercer, J. (2011). Vaccinia extracellular virions enter cells by macropinocytosis and acid-activated membrane rupture. *The EMBO Journal*, 30(17), 3647–3661. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.245>
- Shantier, S. W., Mustafa, M. I., Abdelmoneim, A. H., Fadl, H. A., Elbager, S. G., & Makhawi, A. M. (2022). Novel multi-epitope-based vaccine against monkeypox virus: Vaccinomic approach. *Scientific Reports*, 12, 15983. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20397-z>
- Shchelkunov, S. N., Totmenin, A. V., Safronov, P. F., Mikheev, M. V., Gutorov,

V. V., Ryazankina, O. I., Petrov, N. A., Babkin, I. V., Uvarova, E. A., Sandakhchiev, L. S., Sisler, J. R., Esposito, J. J., Damon, I. K., Jahrling, P. B., & Moss, B. (2002). Analysis of the monkeypox virus genome. *Virology*, 297(2), 172–194. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1446>

Shi, D., He, P., Song, Y., Cheng, S., Linhardt, R. J., Dordick, J. S., Chi, L., & Zhang, F. (2022). Kinetic and structural aspects of glycosaminoglycan–monkeypox virus protein A29 interactions using surface plasmon resonance. *Molecules*, 27(18), 5898. <https://doi.org/10.3390/molecules27185898>

Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories*, 14, 41. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0222-8>

Singh, S., Rao, A., Kumar, K., Mishra, A., & Prajapati, V. K. (2023). Translational vaccinomics and structural filtration algorithm to device multiepitope vaccine for catastrophic monkeypox virus. *Computers in Biology and Medicine*, 153, 106497. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2022.106497>

Solis-Andrade, K. I., Gonzalez-Ortega, O., Govea-Alonso, D. O., Comas-Garcia, M., & Rosales-Mendoza, S. (2022). Production and purification of LTB-RBD: A potential antigen for mucosal vaccine development against SARS-CoV-2. *Vaccines*, 10(10), 1759. <https://doi.org/10.3390/vaccines10101759>

Swetha, R. G., Basu, S., Ramaiah, S., & Anbarasu, A. (2022). Multi-epitope vaccine for monkeypox using pan-genome and reverse vaccinology approaches. *Viruses*, 14(11), 2504. <https://doi.org/10.3390/v14112504>

Taha, A. M., Mahmoud, A. M., Abouelmagd, K., Saed, S. A. A., Khalefa, B. B., Shah, S., Satapathy, P., Shamim, M. A., Sah, S., Serhan, H. A., Donovan, S., Sah, R., & Barboza, J. J. (2024). Effectiveness of a single dose of JYNNEOS vaccine in real world: A systematic review and meta-analysis. *Health science reports*, 7(9), e70069. <https://doi.org/10.1002/hsr2.70069>

Tai, W., Tian, C., Shi, H., Chai, B., Yu, X., Zhuang, X., Dong, P., Li, M., Yin, Q., Feng, S., Wang, W., Zhang, O., Liang, S., Liu, Y., Liu, J., Zhu, L., Zhao, G., Tian, M., Yu, G., & Cheng, G. (2025). An mRNA vaccine against monkeypox virus inhibits infection by co-activation of humoral and cellular immune responses.

Nature Communications, 16(1), 2971. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-58328-x>

Tan, M. J. A., Zhang, R.-R., Shen, T., Li, A., Hou, X., Zhang, Y., Wang, T., Zhang, B., Sun, P., Gong, X., Li, L., Wu, J., Wu, J., Zhang, R., Zhu, L., & Liu, B. (2024). Systematic evaluation of the induction of efficient neutralizing antibodies by recombinant multicomponent subunit vaccines against monkeypox virus. *Vaccine*, 42(26), 126384. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2024.126384>

Tegel, H., Tourle, S., Ottosson, J., & Persson, A. (2010). Increased levels of recombinant human proteins with the *Escherichia coli* strain Rosetta(DE3). *Protein Expression and Purification*, 69(2), 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2009.08.017>

Trujillo García, E. A. (2020). *Desarrollo de una vacuna multiepitópica expresada en tejido vegetal compuesta de determinantes antigénicos de bacterias enteropatógenas* [Tesis doctoral, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.]. Repositorio Institucional del CIBNOR.

U.S. Food and Drug Administration. (2025, May 14). JYNNEOS. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/jynneos>

Vivancos, R., Anderson, C., Blomquist, P., Balasegaram, S., Bell, A., Bishop, L., Brown, C. S., Chow, Y., Edeghere, O., Florence, I., Logan, S., Manley, P., Crowe, W., McAuley, A., Shankar, A. G., Mora-Peris, B., Paranthaman, K., Prochazka, M., Ryan, C., . . . UKHSA Monkeypox Incident Management Team. (2022). Community transmission of monkeypox in the United Kingdom, April to May 2022. *Eurosurveillance*, 27(22), 2200422. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.22.2200422>

Wang, C. Y., Hwang, K. P., Kuo, H. K., Peng, W. J., Shen, Y. H., Kuo, B. S., Huang, J. H., Liu, H., Ho, Y. H., Lin, F., Ding, S., Liu, Z., Wu, H. T., Huang, C. T., Lee, Y. J., Liu, M. C., Yang, Y. C., Lu, P. L., Tsai, H. C., . . . Monath, T. P. (2022). A multitope SARS-CoV-2 vaccine provides long-lasting B cell and T cell immunity against Delta and Omicron variants. *The Journal of Clinical Investigation*, 132(10), e157707. <https://doi.org/10.1172/JCI157707>

Wang, W., Li, J.-X., Long, S.-Q., Liu, Z.-N., Li, X.-P., Peng, Z.-H., Zheng, J.-D., Liao, Y.-H., & Fu, Y. (2025). Emerging strategies for monkeypox: Antigen and

antibody applications in diagnostics, vaccines, and treatments. *Military Medical Research*, 12, 69. <https://doi.org/10.1186/s40779-025-00660-w>

Weiss, R. A., & Sankaran, N. (2022). Emergence of epidemic diseases: Zoonoses and other origins. *Faculty Reviews*, 11, 2. <https://doi.org/10.12703/r/11-2>

Witt, A. S. A., Trindade, G. S., Souza, F. G., Serafim, M. S. M., da Costa, A. V. B., Silva, M. V. F., de Melo Iani, F. C., Rodrigues, R. A. L., Kroon, E. G., & Abrahão, J. S. (2023). Ultrastructural analysis of monkeypox virus replication in Vero cells. *Journal of Medical Virology*, 95(2), e28536. <https://doi.org/10.1002/jmv.28536>

World Health Organization. (2024, August 14). *WHO Director-General declares mpox outbreak a public health emergency of international concern*. <https://www.who.int/news/item/14-08-2024-who-director-general-declares-mpox-outbreak-a-public-health-emergency-of-international-concern>

Wurm, D. J., Veiter, L., Ulonska, S., Eggenreich, B., Herwig, C., & Spadiut, O. (2016). The *E. coli* pET expression system revisited—Mechanistic correlation between glucose and lactose uptake. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(20), 8721–8729. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7620-7>

Jia, X., Lin, S., Yang, F., You, Y., Yang, R., Chen, Z., Guo, L., Yang, J., Wang, L., Yuan, X., Zhang, X., Xu, P., Tong, Q., He, B., Cao, Y., Li, J., Zhao, Q., & Lu, G. (2026). Structural basis of mpox virus A30/H2 subcomplex formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 123(6), e2524604123. <https://doi.org/10.1073/pnas.2524604123>

Yang, X., Sun, Y., Gu, H., Li, D., Zhang, L., Li, T., & Wang, H. (2024). Multi-component protein vaccine induces a strong and long-term immune response against monkeypox virus. *Vaccines*, 12(12), 1410. <https://doi.org/10.3390/vaccines12121410>

Yin, J., Wu, H., Li, W., Wang, Y., Li, Y., Mo, X., Li, S., Ren, Y., Pan, H., Jiang, P., & Wang, Q. (2024). *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit as an adjuvant of mucosal immune combined with GCRV-II VP6 triggers innate immunity and enhances adaptive immune responses following oral vaccination of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish & Shellfish Immunology*, 154,

109969. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109969>

Zaeck, L. M., Lamers, M. M., Verstrepen, B. E., Bestebroer, T. M., van Royen, M. E., Götz, H., Shamier, M. C., van Leeuwen, L. P. M., Schmitz, K. S., Alblas, K., van Efferen, S., Bogers, S., Scherbeijn, S., Rimmelzwaan, G. F., van Gorp, E. C. M., Koopmans, M. P. G., Haagmans, B. L., GeurtsvanKessel, C. H., & de Vries, R. D. (2023). Low levels of monkeypox virus-neutralizing antibodies after MVA-BN vaccination in healthy individuals. *Nature Medicine*, 29(2), 270–278.

<https://doi.org/10.1038/s41591-022-02090-w>

Zhai, Y. Q., Han, Y. Z., Wang, W. L., & Tan, W. J. (2025). Advancements in mpox vaccine development: A comprehensive review of global progress and recent data. *Biomedical and Environmental Sciences*, 38(2), 248–254.

<https://doi.org/10.3967/bes2024.121>

Zhang, R.-R., Wang, Z.-J., Zhu, Y.-L., Tang, W., Zhou, C., Zhao, S.-Q., Wu, M., Ming, T., Deng, Y.-Q., Chen, Q., Jin, N.-Y., Ye, Q., Li, X., & Qin, C.-F. (2023). Rational development of multicomponent mRNA vaccine candidates against mpox. *Emerging Microbes & Infections*, 12(1), 2192815.

<https://doi.org/10.1080/22221751.2023.2192815>

11. Análisis de similitud

TesisM.FCQ.2026.Validación.Armendáriz sin referencias .pdf

Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Detalles del documento

Identificador de la entrega
trn:oid::3117:636772690

Fecha de entrega
9 oct 2026, 2:17 p.m. GMT-6

Fecha de descarga
9 oct 2026, 2:22 p.m. GMT-6

Nombre del archivo
TesisM.FCQ.2026.Validación.Armendáriz sin referencias .pdf

Tamaño del archivo
7.1 MB

74 páginas
17.619 palabras
104.664 caracteres

8% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- ▶ Bibliografía
- ▶ Texto citado
- ▶ Texto mencionado
- ▶ Coincidencias menores (menos de 10 palabras)
- ▶ Abstract
- ▶ Methods and Materials

Fuentes principales

- 7%  Fuentes de Internet
- 1%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.